



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel de la microscopía confocal *ex vivo* en el estudio de la patología renal

Jesús Zacarías Villarreal Martínez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

PAPEL DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL *EXVIVO* EN EL ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA RENAL

Tesis Doctoral

Jesús Zacarías Villarreal Martínez

2024

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Programa de Doctorado

Medicina i Recerca Translacional



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

PAPEL DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL *EXVIVO* EN EL ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA RENAL

Memoria presentada por

Jesús Zacarías Villarreal Martínez

Para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por

Dr. Luis Fernando Quintana Porras

Dra. Adriana García Herrera

Línea de Investigación
Biopatología i bioenginyeria respiratòria, cardiovascular i renal

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Traslacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

A Fania, Jesús y Aina, esto es de ustedes

“La unión hace la fuerza... cuando hay trabajo en equipo y colaboración se pueden lograr cosas maravillosas”

Mattie Stepanek

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es producto del trabajo conjunto durante años, con el Servicio de Nefrología y Trasplante Renal, el servicio de Anatomía Patológica y de Dermatología del Hospital Clinic de Barcelona, a todos los equipos el agradecimiento por vuestra dedicación.

Agradecer siempre al Dr. Luis Fernando Quintana Porras director y tutor de esta tesis doctoral, por ser el gran guía, por animarme cada vez a realizar este y otros trabajos, por la confianza que depositaste en mi persona sin reparo, por ser un ejemplo a seguir tanto en el ámbito académico como en el personal y por siempre darme el apoyo que necesito para lograr todas las metas que he alcanzado. Gracias infinitas.

A la Dra. Adriana García Herrera co-directora de esta tesis, por la confianza depositada, por haberme dado la oportunidad de poder desempeñar con gran entusiasmo este trabajo dentro del servicio y por siempre estar disponible para cualquier inquietud.

A la Dra. Javiera Pérez Anker por la disponibilidad y contribución en el análisis e interpretación de los resultados de este trabajo. Por ser cálida a la hora de explicar todo de forma clara y sencilla, dando sus invaluable puntos de vista y correcciones del protocolo en todas sus versiones.

Al Dr. Marc Xipell Font compañero de mil batallas y amigo entrañable, por su amistad y acompañamiento durante estos años.

A mi esposa Fania, por ser la pieza más importante de mi vida, porque cada día me ha impulsado a terminar con este proyecto, contando con su apoyo en todo momento, sin ti no lo hubiera logrado.

A mi hijos, Jesús y Aina, por ser la razón por la que me levanto cada mañana, por estar ahí mientras leía y escribía, jugando a mi lado, por todo el tiempo que les privé de mi compañía.

A mis padres, Laura y Jesús, por todo lo que han hecho por mí, por estar detrás de mí en cada paso, por apoyarme de manera incondicional y siempre con mucho amor, les estaré siempre agradecido.

FINANCIAMIENTO

Proyecto de investigación en Salud (FIS2017) titulado “Papel de la patología digital y la RNM en la detección precoz de la fibrosis intersticial en la enfermedad renal crónica” con número de expediente PI17/00080 (IP Dr. Luis F. Quintana, ColP Dr. Carlos Nicolau) iniciado el 01/01/2018 con una duración de 3 años y un presupuesto concedido de 87.725,00 euros.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
ARTÍCULOS DE LA TESIS	
Tesis en formato de compendio de publicaciones	3
1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 Estructura renal	11
2.2 Alteración de la estructura renal	15
2.3 Enfermedad renal	19
2.4 Diagnóstico de la enfermedad renal	20
2.4.1. Diagnóstico clínico de la enfermedad renal	21
2.4.2. Diagnóstico histológico de la enfermedad renal Microscopia confocal	22
2.5.1 Principios de la microscopia confocal	27
2.5.2 Evolución de la microscopia confocal ex vivo	31
2.5.3 Preparación de la muestra para la microscopia confocal ex vivo	32
2.5.4 Aplicación clínica de la microscopia confocal ex vivo	34
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	37
3.1 Justificación	39
3.2 Hipótesis	40

3.3	Objetivos del estudio	41
3.3.1	Objetivo principal	41
3.3.2	Objetivos específicos	41
4.	MATERIAL Y MÉTODOS /RESULTADOS	43
4.1	Resumen artículo 1	45
	“Ex vivo confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases”.	
4.2	Resumen artículo 2	56
	“Ex vivo confocal microscopy detects basic patterns of acute and chronic lesions using fresh kidney samples.	
5.	DISCUSIÓN	67
5.1	Flujo de trabajo de la EVCM en biopsias renales no neoplásicas.	71
5.2	Integridad del tejido posterior a la realización de EVCM para estudios moleculares, histoquímicos e inmunohistoquímicos posteriores.	73
5.3	Correlación de las imágenes obtenidas mediante EVCM con la microscopía óptica convencional.	75
5.4	Identificación de patrones de lesión básicos en nefropatología a nivel glomerular, túbulo intersticial y vascular, mediante EVCM	76
5.5	Correlación de los hallazgos de la EVCM con los obtenidos mediante el estudio óptico convencional empleado en nefropatología	77
5.6	Limitaciones del estudio	79
6.	CONCLUSIONES	81
7.	BIBLIOGRAFÍA	83

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado acrónimos y abreviaturas intentando respetar al máximo el término castellano. No obstante, en algún caso se ha recurrido a la terminología anglosajona con el fin de seguir la nomenclatura internacional.

ANCA:	Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo
CFM:	Microscopía confocal
DM:	Diabetes Mellitus
ER:	Enfermedad renal
ERA:	Enfermedad renal aguda
ERC:	Enfermedad renal crónica
ESRD:	Enfermedad renal estadio terminal
EVCM:	Microscopía confocal <i>ex vivo</i>
FCM:	Microscopía confocal <i>ex-vivo</i> con fluorescencia
FuCM:	Microscopía confocal <i>ex-vivo</i> modo fusión
g:	gramo
GAS:	glomerulonefritis aguda post-estreptocócica
GESF:	glomeruloesclerosis segmentaria focal
GNRP:	glomerulonefritis rápidamente progresiva
H&E:	Hematoxilina y Eosina
HTA:	Hipertensión arterial
IF:	Inmunofluorescencia
IFTA:	Fibrosis intersticial y atrofia tubular
IgA:	Inmunoglobulina A
IVCM:	Microscopía confocal <i>in vivo</i>
LES:	Lupus eritematoso sistémico
ME:	Microscopía Electrónica
MPGN:	glomerulonefritis membrano-proliferativa
m ² :	Metros cuadrados

mL/min:	Mililitros por minuto
nm:	nanómetros
PAS:	ácido periódico de Schiff
RCM:	Microscopía confocal <i>ex-vivo</i> con reflectancia
RGB:	rojo, verde, azul
TCP:	Túbulo contorneado proximal
TCD:	Túbulo contorneado distal
TFG:	Tasa de filtrado glomerular
VIH:	Virus inmunodeficiencia humana
\geq :	Mayor o igual que
\leq :	Menor o igual que

Tesis en formato de compendio de publicaciones

1. *Ex vivo* confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases.

Revista: J Nephrol. 2021 Jun; Vol. 34(3):689-697.

Autores: Villarreal JZ, Pérez-Anker J, Puig S, Pellacani G, Solé M, Malveyh J, Quintana LF, García-Herrera A.

Factor de Impacto: 3.4

Cuartil y categoría JCR: Q2 UROLOGY & NEPHROLOGY

EPublicación: Epub 2020 Sep 2

DOI: 10.1007/s40620-020-00844-8.

2. *Ex vivo* confocal microscopy detects basic patterns of acute and chronic lesions using fresh kidney samples.

Revista: Clin Kidney J. 2023 Jan 27;16(6):1005-1013

Autores: Villarreal JZ, Pérez-Anker J, Puig S, Xipell M, Espinosa G, Barnadas E, Larque AB, Malveyh J, Cervera R, Pereira A, Martinez-Pozo A, Quintana LF, García-Herrera A.

Factor de Impacto: 5.860

Cuartil y categoría JCR: Q1 UROLOGY & NEPHROLOGY

Publicación: Enero 2023

DOI: 10.1093/ckj/sfad019

1. RESUMEN

Introducción: A pesar de los avances en el diagnóstico de las enfermedades renales, el estudio histológico mediante la obtención de una biopsia renal percutánea continúa siendo la clave para entender la fisiopatología, llegar a un diagnóstico preciso e implementar un tratamiento oportuno en la mayor parte de las nefropatías. Actualmente la evaluación de rutina de una biopsia renal implica el examen del tejido mediante microscopía óptica convencional, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Algunos inconvenientes de este abordaje son el tiempo requerido para cada técnica, la importancia de la experiencia del patólogo para su interpretación y, ya que el tejido renal extraído es escaso, se reduce la posibilidad de realizar más estudios, como los relacionados con la biología molecular. Estas limitaciones han justificado nuestro interés en la microscopía confocal *ex-vivo* (EVCN) como herramienta complementaria al diagnóstico en nefropatología.

Hipótesis: En este contexto, la presente Tesis Doctoral plantea las siguientes hipótesis:

1: La EVCN es un método óptico que puede proporcionar imágenes a tiempo real del tejido renal humano, comparables en resolución al estudio microscópico convencional, preservando la morfología tisular, celular y las macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos).

2: La evaluación de la biopsia renal mediante EVCN puede proporcionar imágenes digitales que permiten identificar patrones básicos de lesión renal, comparables a los descritos en el estudio de microscopía convencional.

Objetivos:

- 1.1 Evaluar el flujo de trabajo de la EVCN en biopsias renales no neoplásicas
- 1.2 Evaluar la integridad del tejido posterior a la realización de EVCN para estudios moleculares, histoquímicos e inmunohistoquímicos posteriores.

1.3 Correlacionar las imágenes obtenidas mediante EVCM con la microscopía óptica convencional (H&E).

2.1 Identificar patrones de lesión básicos en nefropatología a nivel glomerular, túbulo intersticial y vascular, mediante EVCM

2.2 Correlacionar los hallazgos de la EVCM con los obtenidos mediante el estudio óptico convencional empleado en nefropatología.

Material y métodos:

Primer trabajo: *"Ex vivo confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases"*. Se incluyeron 24 muestras de tejido renal obtenidas de autopsias de individuos con causa de muerte no renal y sin historia clínica de IRA, IRC o ESRD. Se evaluaron: los protocolos de preparación de la muestra para EVCM; la identificación de estructuras normales del tejido renal mediante EVCM en comparación a las secciones histológicas de rutina; el impacto de la técnica de EVCM sobre el procesamiento convencional posterior (técnicas histoquímicas de rutina), la inmunohistoquímica y la extracción de ácidos nucleicos. Segundo trabajo: *"Ex vivo confocal microscopy detects basic patterns of acute and chronic lesions using fresh kidney samples"* Se evaluaron mediante EVCM un total de 48 biopsias de riñón nativo, tomadas por indicación médica. Se valoraron parámetros de lesión glomerular, tubulointersticial y vascular, comparándolos con el estudio óptico convencional.

Los cilindros del tejido renal en fresco fueron preparados para su evaluación mediante EVCM usando naranja de acridina y ácido acético. Los mosaicos confocales fueron obtenidos utilizando el equipo VivaScope 2500 (MAVIG, Munich, Germany) de cuarta generación el cual está equipado con un objetivo de gel de inmersión de 38x, utiliza dos láseres, uno con longitud de onda de 488 nm (azul) y otro de 785 nm (infrarrojo) y tiene una resolución de imagen de 1024x1024 píxeles. El naranja de acridina se excita con el láser azul dando una señal fluorescente (FCM), mientras que el láser infrarrojo genera la señal de reflectancia (RCM).

Ambas señales se detectan simultáneamente y combinadas en tiempo real (FUCM). Mediante un algoritmo integrado, las imágenes fusión se transforman en un gráfico rojo, verde y azul (RVA) parecido a la tinción de hematoxilina y eosina (H&E), asignándole el color azul a la FCM y el color rosa a violeta a la RCM.

Resultados:

Primer trabajo: *"Ex vivo confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases"*. El protocolo de evaluación de las biopsias renales mediante EVCM, permite obtener imágenes digitales en un tiempo inferior a 5 minutos, con una correlación perfecta en la identificación de corteza y médula renal y una correlación muy buena para el número de glomérulos evaluados, el número de glomérulos esclerosados globalmente y la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular. Además, no hay impacto negativo en las tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas realizadas sobre los tejidos procesados de manera convencional post-EVCM, ni en la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos.

Segundo trabajo: *Ex vivo confocal microscopy detects basic patterns of acute and chronic lesions using fresh kidney samples"*. El porcentaje de acuerdo entre la H&E virtual y las alteraciones evaluadas mediante estudio convencional (H&E, PAS, tricrómico y plata) fue superior al 85% en la evaluación de la proliferación extracapilar, la esclerosis segmentaria, la lesión tubular aguda, la fibrosis intersticial, la inflamación intersticial y las lesiones arteriolas crónicas. El índice de correlación kappa fue muy bueno para la proliferación extracapilar, la esclerosis segmentaria y el daño tubular agudo y sustancial para la evaluación de fibrosis e inflamación intersticial y las lesiones vasculares (arteriales y arteriolas) crónicas.

Conclusión: La EVCM permite analizar biopsias de riñón en fresco con una adecuada correlación con las técnicas histológicas convencionales, para la mayoría de los parámetros evaluados; y en un tiempo sensiblemente menor, sin comprometer el estudio óptico convencional de rutina. Por todo lo anterior la implementación de la EVCM podría permitir reestructurar el flujo de trabajo de la

biopsia renal, con potenciales efectos para el manejo de los pacientes con enfermedad renal no neoplásica.

2. Introducción

2. INTRODUCCIÓN

Los riñones son órganos con funciones esenciales para mantener la homeostasis dentro del organismo. Dentro de las funciones que desempeñan se encuentra la de filtrar y eliminar productos metabólicos y toxinas del componente sanguíneo, también participan en el control del líquido extracelular, equilibrio electrolítico y del componente ácido básico. Los riñones también cumplen una función endocrina mediante la producción hormonal (1-25 Vitamina D, eritropoyetina).

Una de las principales funciones de los riñones es la filtración del componente sanguíneo, para llevar a cabo este proceso es indispensable que el riñón cuente con una vascularización significativa, suficiente como para recibir aproximadamente el 20% del gasto cardiaco, lo cual corresponde a un volumen aproximado de 1200 mililitros de sangre por minuto.¹ Las nefronas son las estructuras funcionales encargadas de llevar a cabo el proceso de filtración para la formación de orina.

A nivel histológico este proceso de filtración es llevado a cabo por tres estructuras principales: endotelio capilar glomerular, células especializadas conocidas como podocitos y la membrana basal constituida principalmente por colágeno. Cualquier alteración en estas estructuras histológicas conlleva a patología renal.²

2.1 ESTRUCTURA RENAL

Macroscópicamente, el riñón se divide en dos secciones: una porción externa llamada corteza renal y una interna que es la médula. Ambas contienen diferentes estructuras de la nefrona, la unidad funcional del riñón.³

La nefrona a su vez está compuesta por un glomérulo y un sistema tubular complejo. El glomérulo y la primera porción del sistema tubular, conocida como túbulo contorneado proximal (TCP), se encuentran en la corteza renal. Después del TCP, el asa de Henle, una estructura en forma de horquilla penetra en la médula y regresa a la corteza para conectarse con el túbulo contorneado distal (TCD).⁴ Finalmente, la nefrona drena en el conducto colector a través de túbulos conectores. (Figura 1)⁵

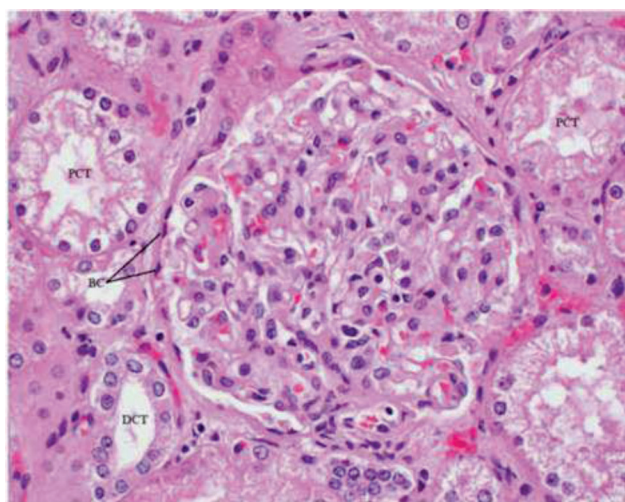


Figura 1. En la porción central observamos el glomérulo renal en la periferia, rodeada por la cápsula de Bowman (BC) y alrededor se observa el túbulo contorneado proximal (PCT) y el túbulo contorneado distal (DCT).⁵

El corpúsculo renal está conformado por múltiples capilares fenestrados en su porción central. Estos capilares tienen una función esencial en la filtración renal. El flujo sanguíneo se regula en amplios rangos de presión, manteniendo así relativamente constante la tasa de filtración glomerular. Esta regulación es llevada a cabo por arteriolas de resistencia, una aferente y otra eferente, las cuales presentan una gran área de superficie para la filtración.⁶

El endotelio capilar glomerular contiene pequeños poros transcelulares o fenestraciones de aproximadamente 60 nm de diámetro, que cubren aproximadamente del 20 al 50% de la superficie endotelial. Estos capilares se

encuentran dentro de la cápsula de Bowman.^{7,8} Las células mesangiales intraglomerulares sostienen físicamente los capilares glomerulares y ocupan los espacios intercelulares debajo de la membrana basal.

Los capilares glomerulares se encuentran suspendidos en el mesangio, el cual está compuesto por células mesangiales y su matriz extracelular. Las células mesangiales son pequeñas, de forma irregular con núcleos heterocromáticos indentados. Las células mesangiales tienen funciones contráctiles y fagocíticas.⁹ La contractilidad de estas células altera el diámetro de los capilares glomerulares en respuesta a cambios en la presión sanguínea, lo que resulta en alteración de las tasas de filtración glomerular. La función fagocítica consiste en eliminar los agregados de proteínas, como los complejos inmunes, que se alojan dentro del filtro glomerular. La expansión de las células mesangiales en algunas enfermedades renales resulta en una reducción del área de filtración y la oclusión de los capilares glomerulares.¹⁰

La cápsula de Bowman consta de una capa visceral y una parietal. La capa visceral interna rodea completamente los capilares glomerulares. Está formada por células epiteliales estrelladas especializadas llamadas podocitos. En contraste, la capa externa o parietal de la cápsula de Bowman es una capa simple de epitelio escamoso.³ Entre ambas capas queda una cavidad denominada espacio urinario o de Bowman, donde se recoge el ultrafiltrado y está en continuidad con la luz del túbulo proximal. (Figura 2)⁵

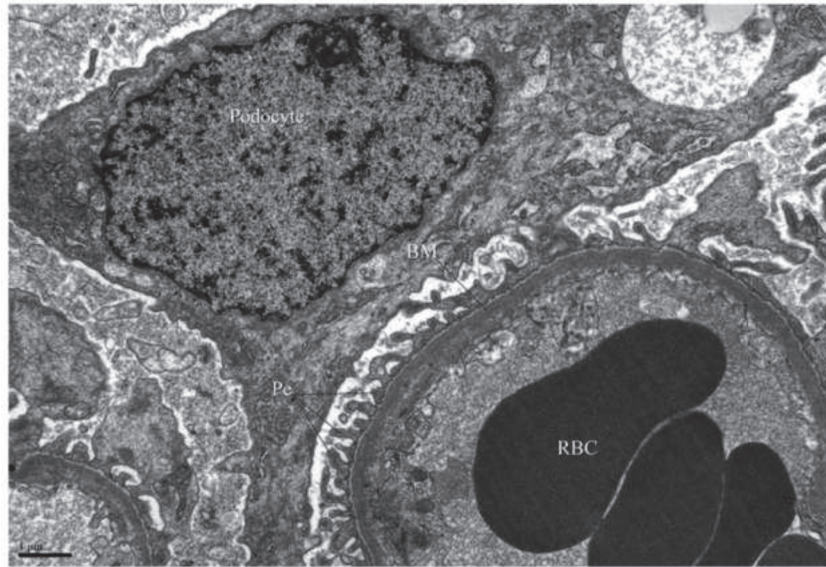


Figura 2. Microscopía Electrónica donde se observa un capilar glomerular y un podocito vecino (podocyte). Los pedicelos (Pe) del podocito descansan sobre la membrana basal (BM) adyacente al endotelio del capilar glomerular fenestrado.⁵

Los podocitos sirven de soporte a los capilares glomerulares y forman parte de la barrera de filtración glomerular. Son células grandes con núcleos eucromáticos y forman la capa visceral de la cápsula de Bowman con exposición al espacio urinario. Los procesos secundarios interdigitados de los podocitos (pedicelos o procesos pediculares) cubren y rodean gran parte de la superficie de los capilares glomerulares.⁴ Estos procesos pediculares contienen actina y se cree que tienen cierta actividad contráctil para oponerse a la distensión de los capilares glomerulares. Los espacios o brechas entre estos pedicelos interdigitados forman poros en forma de hendidura de aproximadamente 30 a 40 nm de ancho.¹¹ Estas hendiduras están cubiertas por una delgada membrana o diafragma de hendidura. Los podocitos tienen capacidad limitada de reparación, pero pueden regenerar sus procesos pediculares. La pérdida de pedicelos se denomina borramiento y también simplificación, retracción o fusión.¹²

La membrana basal glomerular es el tercer componente de la barrera de filtración, junto con el endotelio capilar y los podocitos. Esta se encuentra fusionada a las células endoteliales y los podocitos, y ofrece cierto soporte a los capilares

glomerulares. Por lo tanto, es más gruesa (240 a 270 nm) que otras membranas basales capilares (40 a 80 nm).⁴ Es un material gelatinoso que contiene una red de fibras organizadas en forma de malla que forma poros heterogéneos de 10 nm. El componente principal es el colágeno tipo IV, pero contiene otras proteínas como laminina y heparán sulfato, glicoproteínas y proteoglicanos.¹³

El aparato yuxtamedular es un grupo importante de estructuras ubicadas en la entrada de los capilares en el glomérulo. Dos de estos son estructuras sensoriales especializadas que tienen mecanismos de retroalimentación para regular el flujo sanguíneo glomerular y la tasa de filtración.⁶

1. La mácula densa (punto más grueso) es una región engrosada del túbulo contorneado distal. Se caracteriza por núcleos apicales y células columnares muy compactas. Responde a la concentración de cloruro de sodio en el filtrado tubular y es un sistema de retroalimentación tubuloglomerular que regula la tasa de filtración glomerular. Es importante tener en cuenta que la mácula densa regula el glomérulo que se conecta al túbulo distal, que detecta la concentración de cloruro de sodio.
2. Las células yuxtamedulares (también células granulares) son músculos lisos especializados en las paredes de la arteriola aferente. Estas células sintetizan y secretan renina en respuesta a la disminución de la presión sanguínea arteriolar y activan el sistema renina-angiotensina para regular la presión arterial.
3. Las células de Lacis son células mesangiales extraglomerulares y se encuentran en el tallo del penacho glomerular de capilares. Tienen funciones similares a las células mesangiales intraglomerulares.

2.2 ALTERACION EN LA ESTRUCTURA RENAL

Cualquier anomalía de esta barrera de filtración conduce a condiciones patológicas. De hecho, alrededor del 90% de la enfermedad renal en etapa terminal se debe a alteraciones glomerulares.¹⁴ Las enfermedades glomerulares son

condiciones heterogéneas con una amplia variedad de etiologías y presentaciones clínicas, pero casi universalmente se deben a la alteración de la barrera de filtración glomerular.

Estas enfermedades se manifiestan principalmente por un conjunto de signos que van desde el síndrome nefrítico hasta el nefrótico.¹⁵ Estos síndromes no son enfermedades, sino síntomas, signos y hallazgos de laboratorio que sugieren un trastorno renal subyacente, que con mayor frecuencia implica el glomérulo. Si bien las etiologías y los cambios patológicos que conducen a los síndromes nefróticos y nefríticos son altamente variables, es posible realizar algunas generalizaciones útiles.

El síndrome nefrótico se debe principalmente a la destrucción de los podocitos, partes integrales de la barrera de filtración. La disfunción de los podocitos resulta en pérdidas significativas de proteínas en la orina. Este síndrome se presenta con proteinuria > 3.5 g por 24 horas o relación proteína/creatinina > 3000 mg/g, hipoalbuminemia < 3 g/dL, edema e hiperlipidemia.¹⁶

A su vez, el síndrome nefrótico se puede subdividir en primario o secundario. El síndrome nefrótico primario ocurre cuando el riñón es el único órgano afectado. El síndrome nefrótico secundario es cuando diferentes enfermedades sistémicas ya sean, inmunológicas, metabólicas o vasculares afectan los glomérulos. El síndrome nefrótico secundario es la presentación más común.¹⁷

La nefropatía por cambios mínimos es la forma de síndrome nefrótico primario más común en la edad pediátrica.¹⁸ Es idiopático en la mayoría de los casos, pero a veces se asocia con neoplasias, infecciones recientes o vacunación. Este se caracteriza por una apariencia normal de los glomérulos en la tinción de hematoxilina y eosina (H&E), inmunofluorescencia (IF) negativa, dado que no hay depósitos de complejos inmunes, y en la microscopía electrónica (ME) se puede

observar desaparición (fusión o engrosamiento) de los pedicelos de extensión variable, aunque suele ser extenso.

En la edad adulta, la glomeruloesclerosis segmentaria focal (GESF) es la causa más común del síndrome nefrótico primario en hispanos y afroamericanos.¹⁹ Usualmente es idiopática (primaria) pero puede estar asociada con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), con la enfermedad de células falciformes o con el uso de heroína (secundaria). La GESF se caracteriza por esclerosis focal y segmentaria en la tinción de H&E, una extensa desaparición por fusión o engrosamiento de los pedicelos en la ME, e IF negativa. Este tipo de glomerulopatía a menudo progresa a insuficiencia renal crónica.

La nefropatía membranosa es la etiología más común del síndrome nefrótico primario en adultos de raza blanca. Usualmente es idiopática (primaria) pero puede estar relacionada con hepatitis, enfermedades reumáticas, neoplasias o medicamentos (secundarios).²⁰ Actualmente el diagnóstico y pronóstico se hace mediante medición de anticuerpos anti-PLA2R.²¹ Las características microscópicas encontradas son paredes capilares engrosadas sin proliferación celular en la H&E, en la IF se observan depósitos de inmunocomplejos en la pared del capilar glomerular con imágenes características de “puas” o “spikes” y en la ME se observan depósitos electrodensos homogéneamente distribuidos a lo largo del capilar glomerular.²² Al igual que la GESF, la nefropatía membranosa a menudo progresa a insuficiencia renal crónica.

El síndrome nefrótico secundario puede resultar de enfermedades sistémicas que cursen con complejos inmunes, como el el lupus eritematoso sistémico (LES) o vasculitis; también enfermedades metabólicas como diabetes mellitus (DM) o vasculares con la hipertensión vascular (HTA).²³ La causa más común del síndrome nefrótico secundario es la DM. En la DM, la hiperglucemia conduce a la glicosilación de la membrana basal vascular, causando arterioesclerosis hialina. La arteriola eferente se ve más comúnmente afectada,

aumentando la presión de filtración glomerular (hiperfiltración). Este estado eventualmente progresa a albuminuria, uno de los primeros marcadores clínicos de función renal alterada. Histológicamente se caracteriza por la aparición de esclerosis mesangial y la formación de nódulos de Kimmelstiel Wilson.²⁴

El síndrome nefrítico, por otro lado, ocurre en enfermedades renales atribuidas a la alteración de la membrana basal glomerular. Este cambio patológico se debe principalmente a inflamación de la membrana basal (glomerulonefritis) y se manifiesta clínicamente como HTA, hematuria, proteinuria y azoemia rápidamente progresiva.²⁵

Al igual que el síndrome nefrótico, el síndrome nefrítico también puede tener causas primarias o secundarias. Las causas primarias más frecuentes de síndrome nefrítico es la Glomerulonefritis aguda postestreptocócica (GAS), la Glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), la Nefritis por IgA y la Glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP).

La GAS es la causa más común de glomerulonefritis aguda en niños. En adultos también se puede presentar, pero con una menor incidencia. Esta ocurre después de una infección estreptocócica de la garganta o de la piel, y puede cursar con hematuria, oliguria y hipertensión.²⁶ Microscópicamente, la GAS muestra un patrón granular en la IF, que es más notable en las áreas del glomérulo donde el complejo inmune se ha depositado.

La MPGN es una enfermedad poco común que incluye un grupo de nefropatías glomerulares. Se clasifica en 2 tipos, MPGN con depósito de inmunoglobulinas y complemento (también MPGN por inmunocomplejos) y la Nefropatía C3, que tienen diferentes patrones de depósito exclusivo o dominante de la fracción del complemento C3.²⁷ La MPGN a menudo se asocia con enfermedades autoinmunes, infecciones o gammapatía monoclonal.

La nefritis por IgA (también llamada enfermedad de Berger) es la causa más común de glomerulonefritis en el mundo. Se caracteriza por la presencia de depósitos de IgA en el mesangio glomerular.²⁸ A menudo sigue a una infección del tracto respiratorio superior y es más común en niños y adultos jóvenes. Presenta un curso clínico variable, con algunos pacientes que se recuperan por completo y otros que progresan a enfermedad renal crónica.

La GNRP es una forma de glomerulonefritis que progresa rápidamente a insuficiencia renal en días o semanas. Se puede asociar a la presencia hemorragia alveolar difusa que causa hemoptisis. La etiología es muy variada, pero las causas más frecuentes en adultos suelen ser vasculitis sistémica por anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos [ANCA] y la enfermedad por depósito de anticuerpos anti-membrana basal glomerular.²⁹

2.3 ENFERMEDAD RENAL

La enfermedad renal (ER) es un término general que se utiliza para describir condiciones médicas que afectan a los riñones y pueden detectarse mediante alteraciones del sedimento urinario, proteinuria y/o alteración de la función renal. La enfermedad renal puede manifestarse de dos maneras principales, como enfermedad renal aguda (ERA) o crónica (ERC).

La ERA es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro brusco, (<3meses), de la función renal que se acompaña de retención de productos terminales del metabolismo nitrogenado, como la urea y la creatinina, con o sin alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base asociadas. Suele ser reversible y cursar con oliguria, aunque algunas formas clínicas tienen diuresis conservada o incluso poliuria. La ERA puede tener diversas causas, como lesiones primarias o secundarias del parénquima renal, obstrucciones de la vía urinaria, o en el contexto pre-renal por alteración de la perfusión renal.³⁰ Un metaanálisis

publicado recientemente muestra que la ERA aumenta el riesgo de mortalidad de diferentes causas, así como el riesgo de ERC y ERC terminal.³¹

La ERC es una afección a largo plazo en la que los riñones no funcionan correctamente durante un tiempo prolongado, generalmente de al menos 3-6 meses. Esta afección a menudo progresa lentamente y puede ser causada por diversas condiciones subyacentes, como la diabetes, la hipertensión arterial, o enfermedades glomerulares, entre otras. La ERC suele ser silente al principio, pero a medida que avanza la enfermedad, puede manifestarse con fatiga, edema de extremidades inferiores o cambios en la micción, entre otros síntomas.

Los pacientes con ERC tienen mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y muerte, por lo que el diagnóstico temprano es prioritario para realizar una intervención temprana y así retrasar o evitar el progreso de la enfermedad. Los factores de riesgo para el desarrollo y progresión de la ERC incluyen un bajo número de nefronas al nacimiento, pérdida de nefronas asociado a el proceso de senescencia y episodios frecuentes de lesiones renales agudas.³²

Es importante destacar que la enfermedad renal puede ser grave y tener consecuencias letales para la salud si no se diagnostica y trata adecuadamente. La ERC afecta entre el 10-15% de la población adulta, muchos de los cuales requieren de tratamientos costosos como la diálisis o el trasplante renal, lo cual representa un grave problema de salud pública que impacta de forma global en la cantidad y calidad de vida los individuos y en la viabilidad de los sistemas sanitarios en la mayoría de las poblaciones en el mundo.³⁰

2.4 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD RENAL

La pérdida de la función se puede manifestar morfológicamente por anormalidades patológicas que pueden ser identificados por estudios de imagen, o

bien mediante marcadores bioquímicos, valorables en orina y/o sangre. La enfermedad renal crónica es una pérdida progresiva, permanente e irreversible de la tasa de filtración glomerular (TFG) a lo largo de un tiempo variable, incluso años, y que se expresa por una reducción del aclaramiento de creatinina y se define por una $TFG < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ por ≥ 3 meses con o sin daño renal.

Los mecanismos que dan lugar a la ERC son de origen glomerular, tubular o vascular, los cuales pueden tener una etiología genética, inmunológica, tóxica ya sea exógena (ej. medicamentos) o endógena (ej. glucosa) o deberse a una enfermedad subyacente. Independientemente de la causa de la ERC la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial son hallazgos morfológicos comunes al deterioro funcional.³⁰

2.4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD RENAL

El diagnóstico clínico de las enfermedades renales es fundamental para identificar y tratar de manera adecuada estas condiciones. Es necesario llevar un interrogatorio exhaustivo de los síntomas y antecedentes médicos del paciente. Esto nos ayudará a determinar las pruebas de laboratorio y los estudios de imagen necesarios a indicar para confirmar el diagnóstico.

Existen diferentes signos clínicos y marcadores bioquímicos sanguíneos que nos permiten evaluar la disfunción glomerular. A continuación, mencionaremos los más importantes.

- a) **Proteinuria:** la medición de proteínas en la orina es útil para diferenciar entre síndromes nefróticos o nefríticos y para evaluar la severidad de la enfermedad renal. La proteinuria puede encontrarse en enfermedades glomerulares que cursan con de fuga de proteínas hacia la orina, o por un defecto en la reabsorción de proteínas en los túbulos renales.³⁴ La proteinuria puede causar orina espumosa. Generalmente, una concentración de

proteína muy alta en la orina o "rango nefrótico" > 200 mg/l está asociada con la disrupción de los podocitos, lo que resulta en pérdida de proteínas no selectiva.³³ La proteinuria se asocia generalmente a hipoproteinemia o hipoalbuminemia. El método estándar para la cuantificación de proteínas en orina es la recolección de orina en 24 hrs.

- b) Hematuria: es la presencia de un número anormalmente elevado de hematíes en orina. Se define como la presencia de más de 2 hematíes/campo en el sedimento urinario.³³ En la hematuria microscópica el color de la orina no se modifica, al contrario que en la hematuria macroscópica, donde la orina puede tomar un color rojo o marrón oscuro. La hematuria es un signo cardinal del síndrome nefrítico, se acompaña también de proteinuria, ya que en este síndrome es manifestación de un defecto en la membrana basal glomerular.
- c) Edema: Las pérdidas de proteínas de la sangre resultan en una reducción de la presión oncótica coloidal y un aumento de la filtración desde los capilares, lo que resulta en la acumulación de líquido excesivo y no reabsorbido dentro de los espacios intercelulares. El edema es más notable en manos, tobillos o en zona periorbital. En casos más graves, puede haber ascitis, derrame pleural y anasarca, signos clínicos del síndrome nefrótico.³⁵
- d) Uremia: la urea es el producto final del metabolismo de las proteínas. En el estado urémico encontramos una tasa de filtración glomerular muy reducida; la alteración de la barrera también puede resultar en una reducción de la filtración y, por lo tanto, en la acumulación de productos de desecho como creatinina y nitrógeno ureico en la sangre, entre otros.³³

2.4.2 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD RENAL

La biopsia renal se considera el método más definitivo para el diagnóstico etiológico de la enfermedad renal, especialmente de origen glomerular. Se trata de un procedimiento invasivo de bajo riesgo. Las complicaciones, relacionadas con el sangrado, se presentan sobre todo en pacientes ingresados con cuadros de fracaso

renal agudo.³⁶ Sin embargo, las indicaciones para una biopsia renal dependen en parte no solo de las condiciones del paciente, sino que también de los hallazgos en los estudios de imagen.³⁷ En pacientes con riñones <9cm (medidos por ultrasonido), además de incrementarse el riesgo de complicaciones, la biopsia podría no ser informativa.³⁸

La biopsia renal se realiza en aquellos pacientes en los cuales se han excluido causas pre- renales de enfermedad aguda y se desconoce la etiología. Se utiliza sobre todo cuando tanto la evaluación clínica y de laboratorio indican lesiones que puedan tener respuesta a terapias específicas como: glomerulonefritis rápidamente progresiva, vasculitis, lupus eritematoso sistémico (LES) o la nefritis intersticial aguda. Son indicaciones de biopsia la proteinuria aislada >0.5g/ día, la proteinuria de cualquier cuantía asociada a hematuria con dimorfismo globular o la presencia de cilindros hemáticos o leucocitarios (en ausencia de infección), o la disminución de la TFG de origen no aclarado.³⁹

Según la Sociedad Española de Nefrología, se representan por orden de frecuencia los síndromes clínicos en donde se ha indicado el uso de la biopsia renal (Tabla 1).⁴⁰ Estas indicaciones pueden variar dependiendo de cada centro de nefrología e incluso en cada país, ya sea, porque cambia la incidencia o por diferencia en los criterios diagnósticos de las distintas enfermedades renales.

INDICACIONES DE BIOPSIA RENAL

Síndrome nefrótico idiopático
Alteraciones urinarias asintomáticas: hematuria, microhematuria o ambas
Insuficiencia renal aguda de origen no filiado
Insuficiencia renal crónica
Síndrome nefrítico
Hematuria macroscópica recidivante

Tabla 1. Indicaciones de biopsia renal según la Sociedad Española de Nefrología⁴⁰

Dentro de las contraindicaciones para realizar una biopsia renal son la presencia de alteraciones de la coagulación, la presencia de riñones pequeños o con anomalías anatómicas, infección urinaria activa o HTA descontrolada.

La técnica más utilizada para llevar a cabo la biopsia renal es la punción percutánea eco-dirigida en tiempo real. Existen otros procedimientos alternativos en sujetos de alto riesgo o cuando fracasa la punción. La complicación más grave posterior a la toma de la biopsia es la hemorragia, que se puede resolver en la mayoría de los casos con medidas conservadoras.⁴¹ Los pacientes con mayor riesgo de presentar unas complicaciones posteriores a la toma de la biopsia son los que presentan insuficiencia renal crónica avanzada o HTA, edad avanzada o que cuentan con cortical renal adelgazada. En estos pacientes se encuentra justificado el uso profiláctico de desmopresina.⁴²

El estudio de la histología renal sigue siendo, además, clave para comprender la fisiopatología, de la enfermedad renal. Actualmente, la evaluación de rutina de una biopsia renal implica el examen de tejido bajo microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica.⁴³

La microscopía óptica es la técnica más utilizada para evaluar todas las muestras de tejido obtenidas por la biopsia y proporciona información descriptiva sobre las lesiones existentes en diferentes segmentos del parénquima renal, lo que ayuda a los médicos a determinar diagnósticos diferenciales, particularmente en patologías que afectan los glomérulos. La descripción histológica de las patologías glomerulares incluye términos como “proliferativa” cuando hay un aumento en el número de células, “esclerosante” cuando hay cicatrización y “necrotizante” cuando hay áreas de muerte celular.⁴³ Las lesiones se describen además como difusas o focales si están afectados más o menos del 50% de todos los glomérulos, respectivamente. En un glomérulo individual, el proceso se considera global o segmentario si está afectado más o menos del 50% del glomérulo.

La microscopía óptica utiliza una serie de tinciones para caracterizar diferentes patrones de lesión. Las tinciones más utilizadas son las siguientes:

1. Tinción H&E: utilizada en la evaluación general de todas las muestras.
2. Tinción con ácido periódico de Schiff (PAS): se utiliza ampliamente para evaluar las membranas basales, mesangio y estructuras vasculares.⁴⁴
3. Tinción tricrómica de Masson: utilizada para determinar fibrosis renal.⁴⁵
4. Tinción de metenamina de plata (Jones): útil para una mejor visualización de las membranas basales glomerulares.⁴⁶

La evaluación de la biopsia renal bajo microscopía de inmunofluorescencia (IF) nos permite visualizar proteínas de interés en su contexto celular en las diferentes zonas de la nefrona. La IF se basa en la tinción de células con anticuerpos generados contra una proteína diana que se conjuga directamente con un fluorocromo o se usa junto a un anticuerpo secundario. El examen de rutina generalmente incluye inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, proteínas del complemento (C3, C1q, C4), fibrina y cadenas ligeras kappa/gamma junto con controles apropiados.⁴⁷

En los últimos años, la IF ha tomado un papel muy importante en el diagnóstico y clasificación de enfermedades renales. Actualmente las glomerulonefritis se clasifican según hallazgos de IF; también nos permite evaluar la intensidad de lesiones crónicas y predecir la evolución de ciertas enfermedades como la nefropatía por IgA, nefropatía lúpica y vasculitis renales.⁴⁸⁻⁵⁰

Hay biopsias renales en las que la inmunofluorescencia nos da resultados dudosos y los hallazgos en la microscopía de luz convencional no nos permiten llegar a una conclusión diagnóstica precisa. Estos casos requieren de la ayuda del microscopio electrónico y para ellos deberíamos tener reservado tejido renal para el estudio ultraestructural.

La microscopía electrónica (ME) se ha utilizado ampliamente para diagnosticar muchas enfermedades comunes y poco comunes en nefrología, incluida la enfermedad de cambios mínimos, la glomerulonefritis fibrilar, ciertas clases de nefritis lúpica, el síndrome de Alport y la enfermedad de Fabry.⁵¹ Esta es una de las pocas disciplinas médicas en las que la EM tiene un papel activo en la práctica clínica, y los hallazgos de la EM son necesarios para realizar el diagnóstico final. Por lo tanto, generalmente se recomienda para las biopsias renales preservar una muestra en un fijador apropiado para el examen EM.⁵² La ultraestructura se examina en múltiples niveles para evaluar todos los componentes del glomérulo.

La ME tiene el inconveniente de ser costosa y que no en todos los centros se cuenta con un microscopio electrónico. Se debe de evaluar cada caso en particular para realizar este estudio.

Los principales inconvenientes de la evaluación microscópica convencional incluyen factores como el tamaño de la muestra, la duración e irreversibilidad del procesamiento del material; además de los requerimientos de personal especializado para su interpretación. Estas características plantean limitaciones en el tipo y cantidad de análisis a realizar con el tejido en fresco, pero, sobre todo, restringe los estudios posteriores al procesamiento de la muestra, como los estudios de biología molecular imprescindibles para desarrollar un abordaje diagnóstico que permita incorporar, en el futuro inmediato, un esquema de medicina de precisión en nefrología y la generación de terapias dirigidas para prevenir la aparición de la enfermedad renal en estadio terminal (ESRD).

Por lo anterior, es necesario contar con nuevas metodologías y técnicas que proporcionen una aproximación al diagnóstico histopatológico rápido y preciso, que permitan preservar la integridad del tejido renal para estudios moleculares posteriores y la toma de decisiones terapéuticas individualizadas de forma oportuna, para mejorar el pronóstico del paciente con nefropatía.⁴²

2.5 MICROSCOPIA CONFOCAL

2.5.1 Principios de la Microscopía Confocal

La microscopia confocal (CFM) es una técnica de imagen óptica en el cual se escanea un punto de luz enfocado dentro de una muestra, para luego reconstruir la imagen punto por punto. Para ello se utiliza como fuente de luz un láser (que permite controlar la profundidad de campo), asociado a espejos dicróicos (que tienen la propiedad de reflejar la luz selectivamente en función de una determinada longitud de onda), lentes de objetivo (diseñados para recoger la luz y ampliar la imagen de la muestra) y un diafragma de detección confocal o “pinhole”, que rechaza la luz desenfocada, aumentando la resolución y el contraste en comparación con la iluminación de campo amplio de la microscopia convencional.⁵³ (Figura 3).

Puesto que en la CFM sólo se ilumina un punto cada vez de la muestra, se requiere un escaneo del espécimen estudiado para reconstruir las imágenes bi- o tridimensionales mediante el uso de ordenadores (útiles en la visualización, procesamiento, salida y almacenamiento de las imágenes).⁵⁴⁻⁵⁶

La microscopía confocal permite realizar cortes ópticos en serie, directos y no invasivos, de muestras in vivo o ex vivo, gruesas e intactas con un mínimo de preparación de la muestra, mejorando la resolución de la imagen en muestras gruesas, en comparación con la microscopía de campo amplio.⁵⁷

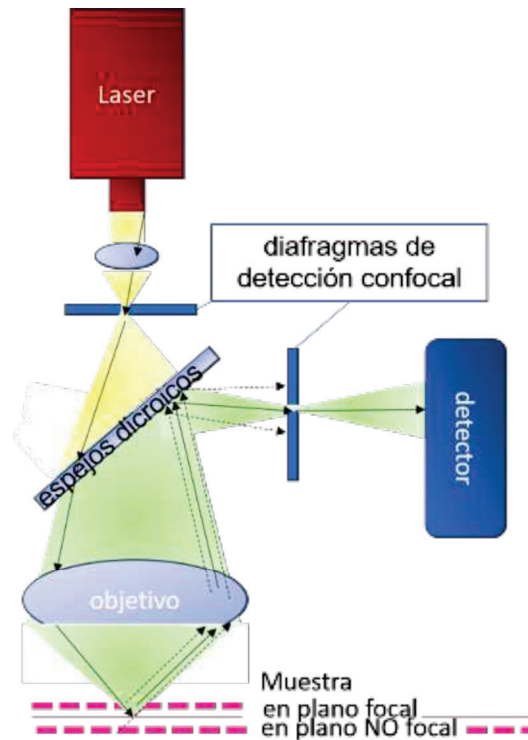


Figura 3. Esquema que muestra el principio de la microscopía confocal.

La microscopia confocal *in vivo* (IVCM) es una técnica no invasiva que permite evaluar tejidos que se encuentran al alcance, tales como la piel, ojo y mucosas o de forma indirecta mediante endomicroscopía como son el tracto gastrointestinal, genitourinario, pulmones o el sistema nervioso central.^{58, 59} Esta técnica no invasiva, nos permite obtener una imagen casi histológica de un tejido determinado, evitando así una biopsia innecesaria.

La IVCM utiliza un modo de reflectancia (RCM) en donde nos es posible observar una imagen de alta resolución en una escala de grises. Algunos de los componentes celulares que se pueden distinguir son: núcleos celulares, colágeno y células sanguíneas circulantes. El mecanismo de acción de la RCM se basa en las diferencias de dispersión de la luz de las diferentes estructuras celulares, organelas y la matriz extracelular, los cuales actúan como cromógenos internos dando señales en diferentes escalas de grises (las más próximas al blanco se describen como hiperreflectivas y las más próximas al negro como hiporreflectivas).⁶⁰

Con la IVMC se pueden reconocer diferentes enfermedades, entre ellas diferentes desórdenes pigmentarios de la piel, algunas enfermedades inflamatorias y tiene diferentes aplicaciones en el campo del envejecimiento cutáneo.⁶¹

A diferencia de la IVMC, la microscopia confocal *ex vivo* (EVCN), permite un examen microscópico en tiempo real, de un tejido recién extirpado no procesado con un alto nivel de resolución, comparado casi con el de una imagen histológica. La EVCN trabaja dos diferentes modalidades, un modo de reflectancia, con una longitud de onda de 830 nm, también utilizado en la IVMC y un modo de fluorescencia, el cual utiliza una longitud de onda de 488 a 658 nm, mayormente utilizado en la EVCN.⁶²

En el modo de RCM de la EVCN se obtendrán imágenes en diferentes escalas de grises al igual que en la IVMC. Las imágenes visualizadas son estructuras hiporreflectantes oscuras y estructuras hiperreflectantes brillantes.⁵⁶

El modo de fluorescencia (FCN) de la EVCN utiliza diferentes fluorocromos que se unen a estructuras celulares específicas, resaltando su señal en diferentes intensidades de verde. Los fluorocromos más utilizados son el naranja de acridina, el azul de metileno, el azul de toluidina, el azul de Nilo y la fluoresceína o azul V de patente.⁶³ Estos fluorocromos actúan como las tinciones histológicas e interactúan con las diferentes longitudes de onda del láser de la EVCN en el tejido diana emitiendo una imagen. Las imágenes no fluorescentes se observarán oscuras, comparadas con las fluorescentes que se observarán blancas. Hasta la fecha, solo se encuentra disponible un dispositivo de EVCN, el VivaScope 2500 (MAVIG GMBH, Munich, Alemania).⁶²

Los fluorocromos teñirán los núcleos celulares de blanco, lo cual va a permitir una mejor visualización del tejido. De forma consecuente, la nitidez de las imágenes

es directamente proporcional a la cantidad de núcleos encontrados en los tejidos, donde en tejido linfático o tumoral, se observará brillante, mientras que en tejido fibroso o adiposo tendrá una fluorescencia baja o ausente.⁶² En situaciones especiales, donde tejidos como músculo y tejido adiposo, que no contienen gran número de células nucleadas, se puede utilizar la combinación de ambos modos, reflectancia y fluorescencia, llamada también modo fusión (FuCM) para obtener imágenes más fidedignas.^{58, 59} (Figura 4).

Estos nuevos dispositivos que combinan CFM y RCM, obtienen información más detallada de los tejidos escaneados. Además, las imágenes obtenidas se generan con una tinción digital de hematoxilina-eosina, lo que facilita la interpretación por parte de patólogos y cirujanos.

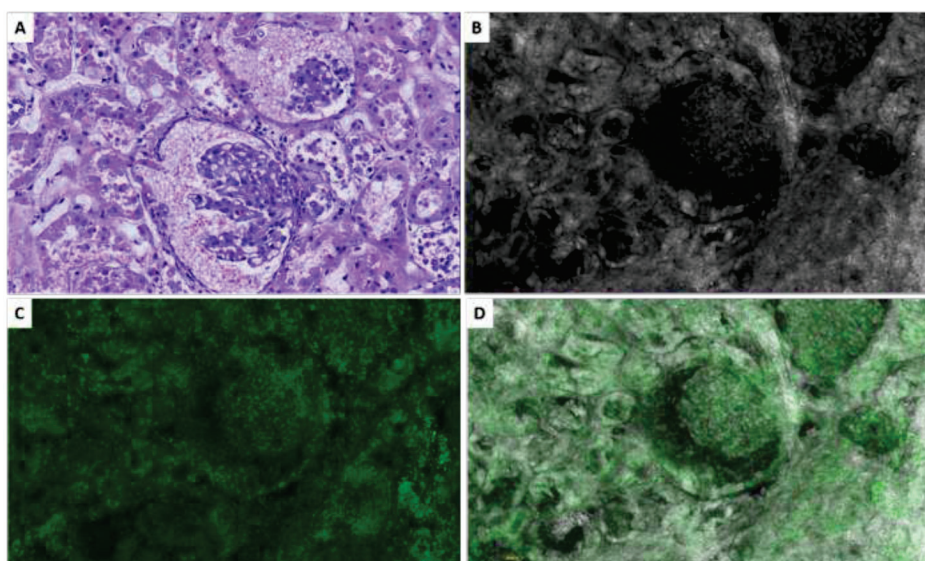


Figura 4: Muestra de córtex renal, tejido autopsico: A) Tinción de H&E microscopia óptica convencional, B) Microscopia confocal reflectancia (RCM), C) Microscopia confocal fluorescencia (FCM), D) Microscopia confocal modo de fusión (FuCM). *Fotografía cortesía García-Herrera A. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.

2.5.2 EVOLUCIÓN DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL *EX VIVO*

Los primeros dispositivos de EVCM para uso clínico, funcionaban con un único láser de diodo de 830 nm de longitud de onda y adquirían imágenes exclusivamente en modo RCM.^{64, 65} Posteriormente se configuraron equipos con tres fuentes de laser: un láser de fluorescencia (488nm) y dos de reflectancia (830nm y 658nm), por lo que se podían generar imágenes de RCM, FCM y FuCM, con el inconveniente de un mayor tiempo de escaneo del tejido. La cuarta generación VivaScope® (MAVIG GmbH, Múnich, Alemania) combina un láser de reflectancia (785nm) y otro de fluorescencia (488nm), permitiendo obtener imágenes de fusión, que a su vez son convertidas mediante un algoritmo informático en imágenes que remedan la hematoxilina y eosina (H&E) “H&E virtual”. En esta tinción virtual, el algoritmo genera una imagen RGB dando un color azul a la señal de fluorescencia (verde) y rosa- púrpura a la señal de reflectancia (gris)^{53,59}. (Figura 5).

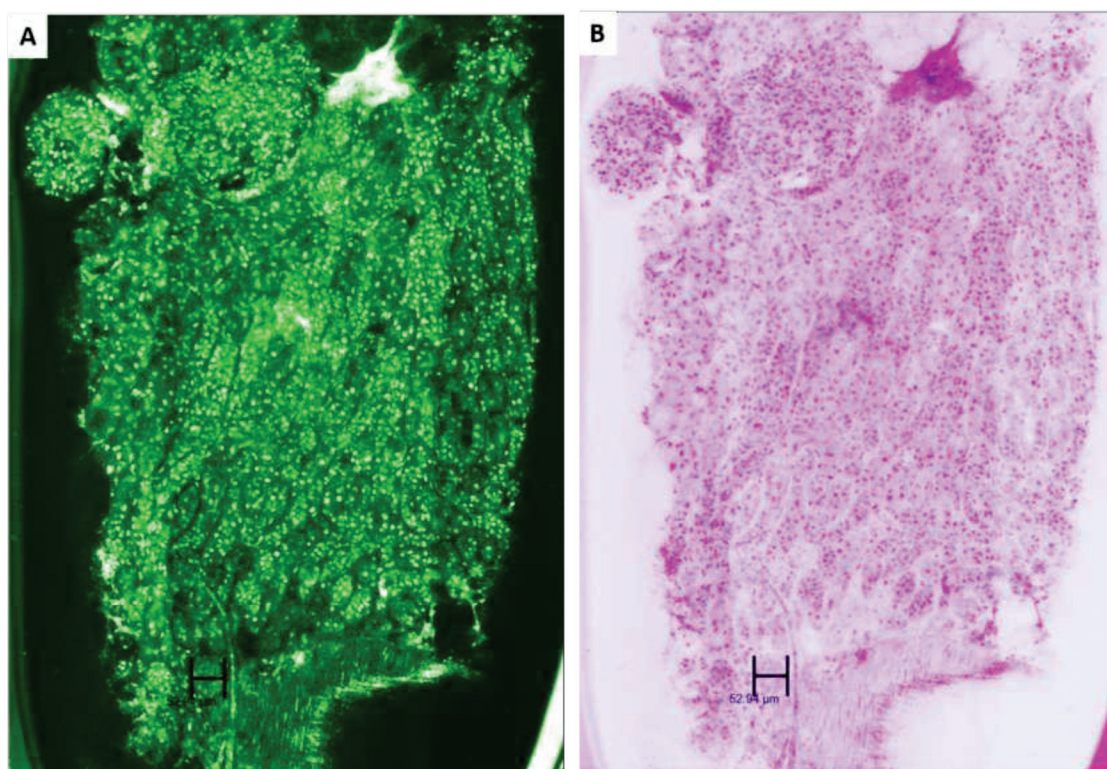


Figura 5: Fragmento de cortex renal A) microscopia confocal *ex vivo* en modo fusión (FuCM), B) H&E virtual. *Fotografía cortesía García-Herrera A. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.

2.5.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA EVCM

El tejido obtenido de una biopsia se mantiene húmedo sobre un papel filtro empapado en solución salina. A continuación, se procede a sumergir el tejido en un fluorocromo (naranja de acridina 1mmol/L) durante 20 segundos, se aclara en abundante solución salina hasta la eliminación del exceso de tinción, se vuelve a sumergir en ácido acético al 50% durante 20 segundos, y finalmente se vuelve a aclarar en solución salina (Figura 6).

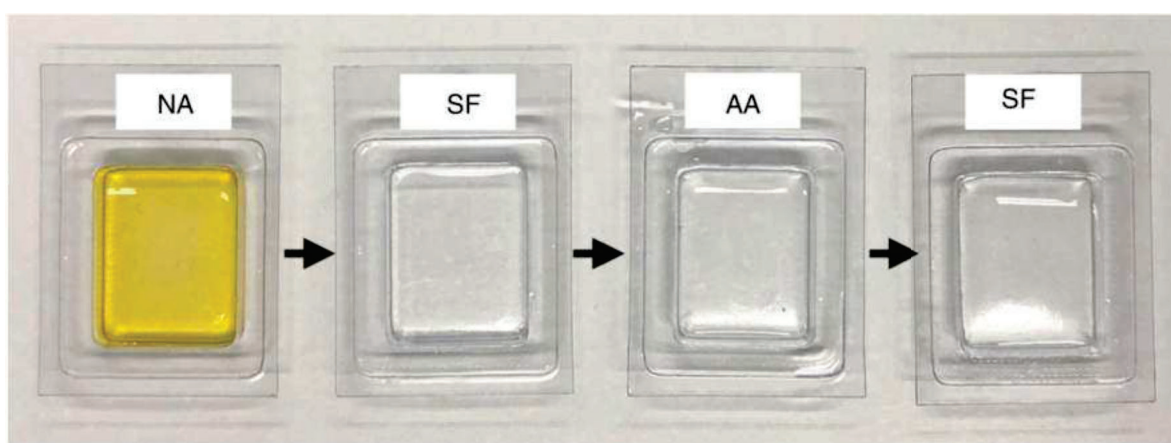


Figura 6: Proceso de preparación de la muestra para EVCM: NA: naranja de acridina; AA: ácido acético; SF: suero fisiológico. *Fotografía cortesía García-Herrera A. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.

Cuando se completa el proceso de preparación de la muestra, se procede a colocar la muestra teñida encima de una lámina portaobjetos y se aplica un cubreobjetos.

Para favorecer que la biopsia quede firme y homogéneamente apoyada sobre el portaobjetos, pero sin comprimirla, se usa arcilla modeladora en los extremos de la lámina portaobjetos. Se debe prestar especial atención a eliminar cualquier burbuja de aire de la preparación, la cual puede generar un artefacto a la hora de la evaluación (Figura 7). Antes de iniciar el escaneo de la muestra con el dispositivo VivaScope® (MAVIG GmbH, Múnich, Alemania) 4ª generación, se deberá aplicar una cantidad suficiente de gel de ecografía sobre el objetivo que transmitirá la luz láser.

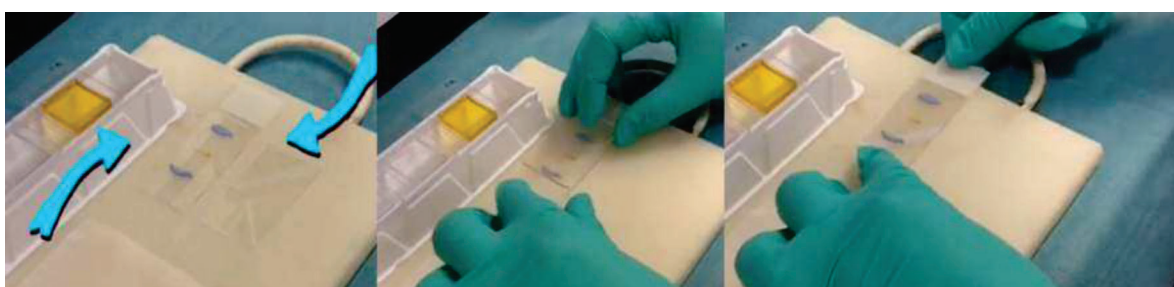


Figura. 7: Posicionamiento de la muestra sobre el portaobjetos y apoyo del cubreobjetos con ayuda de arcilla modeladora. Este paso es crítico para que el tejido quede apoyado sin burbujas para su escaneo. *Fotografía cortesía García-Herrera A. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.

En este momento el operador técnico, determinará el «punto cero» de escáner. Este punto se refiere a la profundidad a la que las estructuras tisulares pueden ser enfocadas en su máxima nitidez y homogeneidad de tonos, previamente al inicio del proceso de escaneo (Figura 8). La intensidad de cada láser se ajusta para obtener la luminosidad y homogeneidad adecuada de la imagen final resultante. Finalmente, se visualiza el tejido escaneado seleccionado mediante el láser de fluorescencia, de reflectancia o de fusión o a través de tinción digital.

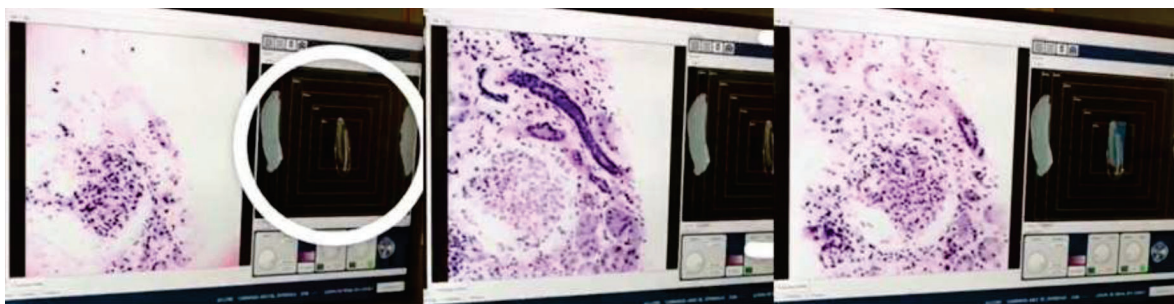


Figura 8: Determinación del punto 0 de escáner (zona de mejor enfoque). *Fotografía cortesía García-Herrera A. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.

2.5.4 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL *EX VIVO*

La principal aplicación de la EVCM en la actualidad es la relacionada con procesos quirúrgicos oncológicos. En el área de la dermatología se ha demostrado que la EVCM aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de tumores cutáneos al examinar los márgenes de escisión en la cirugía de Mohs.^{66, 67} (Figura 9) Dentro de la oncología también se ha probado en diferentes tejidos (mama, tiroides, colorrectal, ganglios linfáticos) con resultados prometedores.⁶⁷⁻⁷³

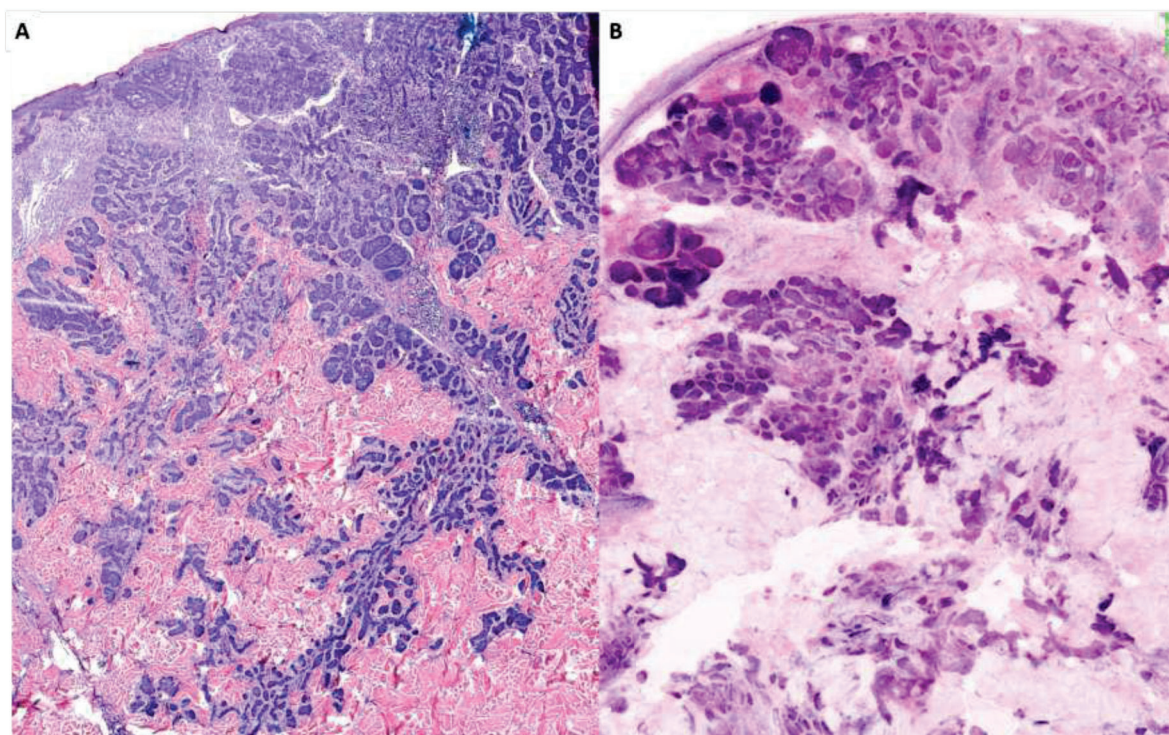


Figura 9: Sección de carcinoma basocelular cutáneo A) Imagen de H&E convencional B) Imagen de H&E virtual. *Fotografía cortesía García-Herrera A. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.

En el campo de la nefrología, existen pocos artículos que señalan el uso de la IVCN y la EVCM. Campo-Ruiz y colaboradores publicaron en el 2006 sus hallazgos del uso de la RCM in vivo y ex vivo en el estudio del riñón en modelo murino.⁷² Las imágenes observadas de los túbulos renales, los glomérulos y el intersticio, se correlacionaron altamente con la histología de hematoxilina y eosina a nivel estructural y celular. Dentro de sus conclusiones señalaron que estos métodos diagnósticos pueden evitar biopsias renales peligrosas o inviables, como por ejemplo en un riñón pre-trasplante, o el uso en pacientes con coagulopatía grave.

En el 2015, Su y colaboradores reportaron el uso de la EVCM utilizando un láser endomicroscópico en la evaluación de tumores renales.⁷⁴ Este estudio

proporcionó una excelente discriminación de los diferentes componentes anatómicos dentro del tejido renal normal, incluidos los túbulos, los glomérulos, el sistema colector y la grasa perirrenal de forma análoga a la encontrada en el estudio histopatológico. También se encontró utilidad para identificar tejido tumoral y tejido normal. Sin embargo, los subtipos de tumores malignos no se encontraron tan bien delimitados como los tumores benignos debido a la penetración limitada de la fluoresceína en las células tumorales.

En el 2019, Phung y colaboradores realizaron un estudio en 11 pacientes sometidos a nefrectomía parcial con presencia de tumores renales.⁷⁵ Las tumoraciones se tiñeron con naranja de acridina y se realizó estudio por EVMC. Se obtuvieron 17 muestras de tejido y 118 imágenes por EVMC, de las cuales 66 fueron diagnosticadas como tumoraciones malignas y 52 fueron tumoraciones benignas. La sensibilidad y especificidad de la evaluación de estas imágenes por personas entrenadas en este estudio fue de 98 y 81% respectivamente. Los investigadores concluyeron que la EVMC es útil para distinguir cáncer de tejido normal con alta sensibilidad y especificidad.

En el 2020, Mir y colaboradores realizaron un estudio con 4 pacientes consecutivos con tumores renales.⁷⁶ Las muestras fueron tomadas del centro de las lesiones sospechosas, las cuales fueron teñidas con naranja de acridina por 30 segundos y posteriormente se sometieron a evaluación con Vivascope 2500 (uso de 2 longitudes de onda de 488 nm en el RCM y 785 nm para el modo de fluoroscopia). Las imágenes se obtuvieron en 2-4 minutos y en el 100 % permitieron reconocer el tejido parenquimatoso normal y el tumoral. Los autores concluyen que tuvieron dificultades para la obtención de imágenes por falta de penetración de la luz del láser, pero en general observaron detalles arquitectónicos y la caracterización de los núcleos renales permitieron la identificación del tejido sano vs el tejido afectado.

3. Justificación, Hipótesis y Objetivos del estudio

3.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El análisis de anatomía patológica se basa en localizar la región de interés en el portaobjetos, utilizando un aumento de baja resolución para después utilizar un lente de mayor aumento para examinar la región con una más alta resolución. A lo anterior se le denomina examen piramidal y representa la segmentación histológica en los compartimentos renales tisulares. Actualmente se puede evaluar un tejido mediante microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Sin embargo, estos procesos son laboriosos e irreversibles, restringiendo el tipo y cantidad de análisis a realizar con el tejido en fresco, pero sobre todo la realización de estudios posteriores al procesamiento de la muestra.

Solventar estos inconvenientes es una necesidad imperiosa para optimizar el diagnóstico en patología renal lo que justifica el creciente interés en el potencial papel de nuevos abordajes técnicos para el estudio de la biopsia renal que permitan gestionar de forma más eficiente el escaso, pero muy valioso material obtenido durante este procedimiento.

La microscopia confocal permite la visualización in situ de células dentro de un tejido determinado, permitiéndonos obtener imágenes de estructuras a nivel celular equiparado a un corte histológico. Hasta la fecha, la microscopia confocal ex vivo se ha establecido como una técnica útil en la evaluación de tumoraciones renales, donde se ha logrado la diferenciación de tejido afectado vs. tejido normal. Esta técnica puede usarse en un primer estadiaje, comparándola después con los resultados obtenidos en el estudio histopatológico. Esta técnica nos permite evaluar el tejido de forma rápida y precisa, evitando largos retrasos mayores costos y morbilidad potencial asociados a la sección congelada.

3.2. HIPÓTESIS

Ya que no existen estudios hasta la fecha, que demuestren la utilidad de la microscopía confocal *ex vivo* en la evaluación de patología renal no neoplásica, establecemos la hipótesis de que el uso de esta técnica nos permitirá evaluar de forma rápida y precisa el tejido obtenido de forma inmediata posterior a la obtención de una biopsia renal. La pronta evaluación del tejido renal patológico nos permitirá obtener diagnósticos certeros con un tiempo de espera mucho menor al de un estudio histopatológico.

La presente tesis doctoral plantea 2 hipótesis:

1. UTILIDAD DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL *EX VIVO* EN EL ANÁLISIS DEL TEJIDO RENAL EN FRESCO.

La Microscopía confocal *ex vivo* es un método óptico que puede proporcionar imágenes a tiempo real, del tejido renal humano, comparables en resolución al estudio microscópico convencional, sin alterar la morfología tisular, celular y la integridad de las macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) para estudios posteriores.

2. IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE LESIÓN AGUDA Y CRÓNICA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL *EX VIVO* UTILIZANDO BIOPSIAS RENALES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL NO TUMORAL.

La evaluación de la biopsia renal mediante Microscopía confocal *ex vivo* puede proporcionar imágenes digitales que permitan identificar los patrones básicos de lesión renal, comparables a los descritos en el estudio de microscopia óptico convencional.

3.3 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

3.3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

1. Establecer los posibles usos de la Microscopía confocal *ex vivo* en el estudio de la biopsia renal dentro de la práctica clínica.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el flujo de trabajo de la Microscopía confocal *ex vivo* en biopsias renales no neoplásicas
2. Evaluar la integridad del tejido posterior a la realización de Microscopía confocal *ex vivo* para estudios moleculares, histoquímicos e inmunohistoquímicos posteriores.
3. Correlacionar las imágenes obtenidas mediante Microscopía confocal *ex vivo* con la microscopía óptica convencional.
4. Identificar patrones de lesión básicos en nefropatología a nivel glomerular, túbulo intersticial y vascular, mediante Microscopía confocal *ex vivo*
5. Correlacionar los hallazgos de la Microscopía confocal *ex vivo* con los obtenidos mediante el estudio óptico convencional empleado en nefropatología

4. Material y Métodos/ Resultados

4. MATERIAL Y MÉTODOS/ RESULTADOS

4.1 RESUMEN ARTÍCULO 1

“Ex vivo confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases”.

Introducción: La microscopía confocal *ex vivo* es una técnica para analizar tejidos, que permite generar imágenes de muestras frescas con una resolución óptica comparable a las obtenidas por métodos convencionales de patología. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de EVCM en el modo de FUCM y la H&E virtual resultante para el reconocimiento de estructuras normales en el tejido renal.

Métodos: Se incluyeron 24 muestras de tejido renal obtenidas de autopsias de individuos con causa de muerte no renal y sin historia clínica de IRA, IRC o ESRD. Las muestras fueron estudiadas mediante EVCM (VivaScope 2500 MAVIG, Munich, Alemania) y posteriormente procesadas de manera rutinaria. Los casos se analizaron mediante las dos técnicas, para identificar estructuras normales y patológicas del tejido renal. Así mismo se evaluó el impacto de la técnica de EVCM sobre el procesamiento convencional posterior, las técnicas histoquímicas de rutina, la inmunohistoquímica y la extracción de ácidos nucleicos.

Resultados: El protocolo de evaluación de las biopsias renales mediante EVCM, permite obtener imágenes digitales en un tiempo inferior a 5 minutos, con una correlación perfecta en la identificación de corteza y médula renal y una correlación muy buena para el número de glomérulos evaluados, el número de glomérulos esclerosados globalmente y la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular. Adicionalmente no hay impacto negativo en las tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas realizadas sobre los tejidos procesados de manera

convencional post-EVCM, así como tampoco en la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos.

Conclusión: Las imágenes obtenidas mediante EVCM de la biopsia renal, muestran resultados prometedores para su futura aplicación en la práctica clínica nefrológica y el trasplante renal.



Ex vivo confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases

Jesús Z. Villarreal^{1,2} · J. Pérez-Anker³ · S. Puig^{3,4} · G. Pellacani⁵ · M. Solé^{6,7} · J. Malveyh^{3,4} · Luis F. Quintana^{1,2,7} · A. García-Herrera^{6,7}

Received: 2 April 2020 / Accepted: 13 August 2020
© Italian Society of Nephrology 2020

Abstract

Background Ex vivo confocal microscopy is a technique for tissue examination, which generates images of fresh samples with an optical resolution comparable to those obtained by conventional pathology. The objective of this study was to evaluate the feasibility of using ex vivo confocal microscopy in fusion mode (reflectance and fluorescence) and the H&E-like digital staining that is obtained for the analysis of non-neoplastic kidney biopsies.

Methods Twenty-four renal samples acquired from autopsies were scanned in a 4th generation ex vivo confocal microscopy device. The imaging process was completed in an average of three minutes.

Results Confocal images correlated very well to the corresponding conventional histological sections, both in normal tissue and in chronic lesions (glomerulosclerosis, fibrosis and tubular atrophy). The ex vivo confocal microscopy protocol did not add artifacts to the sample for the ulterior study with light microscopy, nor to the histochemical or immunohistochemical studies.

Conclusion The ease and speed of grayscale and fluorescence image acquisition, together with the quality of the H&E-like digitally stained images obtained with this approach, suggest that this technique shows promise for use in clinical nephrology and renal transplantation.

Jesús Z. Villarreal and J. Pérez-Anker contributed equally to this manuscript.

Luis F. Quintana and A. García-Herrera share senior authorship.

✉ Luis F. Quintana
lfquinta@clinic.cat

¹ Nephrology and Renal Transplantation Department, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

³ Dermatology Department, Melanoma Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August

Pi I Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

⁵ Department of Dermatology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

⁶ Pathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ Centro de Referencia en Enfermedad Glomerular Compleja del Sistema Nacional de Salud (CSUR), Barcelona, Spain



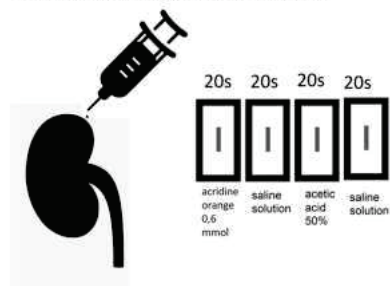
Graphic abstract

Is ex vivo Confocal Microscopy reliable for real time assessment in nephropathology?

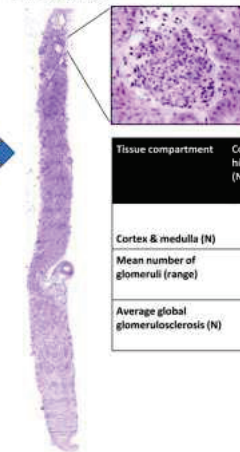
Ex-vivo confocal microscopy is a technique for tissue examination, which generates images of fresh samples with an optical resolution comparable to those obtained by conventional pathology

Methods

Renal samples acquired from necropsies



Results



Tissue compartment	Conventional histology (N=24)	Ex vivo confocal imaging (N=24)	Statistic
Cortex & medulla (N)	8	8	Kappa=1
Mean number of glomeruli (range)	10 (1-22)	9 (2-23)	Lin=0.97 (0.4-0.98)
Average global glomerulosclerosis (N)	0.83	0.77	Kappa=0.6

Conclusion: The facility and speed of the digital staining H&E-like images obtained with this approach, suggest that this technique has promise for use in clinical nephrology and renal transplantation.

Keywords Reflectance confocal microscopy · Fluorescence confocal microscopy · Fusion confocal microscopy · Ex vivo confocal microscopy · Renal biopsy

Introduction

The study of renal biopsy continues to be the key in implementing a specific treatment in nephrology [1–4]. However, routine histopathological evaluation is a time-consuming and irreversible process in a very small amount of tissue. These characteristics pose limitations in terms of the type and quantity of analysis to be carried out with the fresh tissue and restricts the performance of post-processing molecular studies [4]. Confocal microscopy (CM) is a real-time technique which provides high-resolution images of fresh, non-fixed tissues, in both in vivo and ex vivo approaches [5, 6]. Different devices are used for each technique. In vivo CM is largely used in many clinical settings to enhance diagnostic and treatment capabilities, mainly in the area of dermatology and ophthalmology [7, 8].

In CM, a laser is used to provide excitation light while mirrors are used to scan the laser across the sample. The emitted light is captured through a pinhole (confocal aperture) and measured by a detector attached to a computer. Finally, the computer builds up a two-dimensional grayscale image (reflectance CM [RCM]), one pixel at a time. Confocal microscopy has also been coupled with the use of fluorescent dyes

(fluorescence CM [FCM]). This provides enhanced contrast in imaging and allows the staining of specific structures [5].

Fusion mode (RCM plus FCM [FUCM]), using laser light with sources of different wavelengths, represents the cutting-edge approach in ex vivo CM. It permits the acquisition of an H&E-like digital stain (virtual H&E), imparting a blue color to FCM and a pink to purple color to RCM [9]. Ex vivo FUCM has been tested mainly in the field of oncology, focusing on different tissues (skin, prostate, breast, lung, kidney and liver) with promising results [10–12].

The aim of this proof of concept study was to assess the performance of the ex vivo CM in fusion mode on non-neoplastic renal biopsies and to evaluate the integrity of the tissue imaged for the subsequent molecular, histochemical and immunohistochemical analysis. In order to highlight limitations and possible applications of this technology in the diagnosis of renal non-neoplastic pathology, the confocal images were correlated to the corresponding histological sections obtained by conventional methods.

Methods

Study sample and tissue collection

This prospective study included 24 renal samples from autopsies of individuals who died of non-renal diseases and without renal involvement. Tissue specimens were obtained with an automated spring-loaded biopsy device; a wedge biopsy was also performed in one case. Samples were kept moist on saline-soaked gauze prior to imaging. The study was approved by the ethics committee of the Hospital Clinic, Barcelona and was conducted in accordance with the precepts of the Helsinki Declaration. All the data were handled anonymously.

Ex vivo confocal microscopy in fusion mode

Samples were immersed in acridine orange (AO) 0.6 mmol for 20 s, then washed in saline solution for 20 s, immersed in acetic acid 50% for 20 s, and finally rinsed again in saline solution for 20 s. The tissue was placed on a conventional histopathology slide and covered by a coverslip retaining the specimen in the same position during the scanning.

Confocal mosaics were acquired using the 4th Gen VivaScope 2500 (MAVIG GmbH, Munich), specially designed for ex vivo imaging of freshly excised tissue samples. The 2500 M-G4, equipped with a 38× gel immersion objective, uses two lasers with wavelengths of 488 nm (blue) and 785 nm (infrared) and resolution image of 1024×1024 pixels. AO is excited by the blue laser (FCM), whereas the infrared laser is used to generate a reflectance signal (RCM). Both the reflection and fluorescence signals are detected simultaneously and combined in real time. An integrated algorithm, that is provided with the microscope, linearly combines the FCM and RCM images to form an RGB output graphic (virtual H&E) which resembles H&E stained pathology slides, assigning a blue color to FCM and pink to purple color to RCM.

DNA and RNA isolation and quantification

DNA and RNA were isolated from one tissue sample imaged with CFM using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen), per the manufacturer's instructions. DNA was quantified using the Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Formalin-fixed and paraffin-embedded analyses

After ex vivo CM, the tissue was immediately fixed in 10% neutral-buffered formalin, subjected to routine processing, and embedded in paraffin wax to generate tissue blocks for comparison with standard pathologic analysis. In order to recognize the potential for interference in

immunohistochemistry, samples were tested with a cytoplasmic antigen (cytokeratin [CK7]) and with a nuclear antigen [GATA binding protein 3 (GATA3)].

The whole slide imaging was performed on a Ventana iScan HT (Roche Diagnostics, Spain) at a magnification of 400×. The system creates high-resolution digital images of the tissue sections. The entire scanning process runs automatically [13]. The images were blindly viewed in the Virtuoso viewer (Roche). The virtual pathology and the ex vivo CM images were simultaneously evaluated.

Statistical analysis

Concordance between conventional histology and ex vivo CM was assessed with Kappa coefficient for qualitative (categorical) histological variables. For the number of glomeruli, Lin's concordance correlation coefficient was used. Coefficients were expressed as estimation and a 95% confidence interval (CI). All *P* values were two-tailed and were considered significant <0.05. The software used for statistical analyses was R version 3.5.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019).

Results

A total of 24 renal specimens were imaged. For each sample, image acquisition was repeated one to three times in order to obtain an interpretable mosaic. It took up to 5 min (2–5 min) to analyze a 12–16 mm sized specimen and to obtain a single mosaic. The ex vivo CM displayed mosaics that reproduce the architecture of a normal kidney, in real time with cellular resolution (Fig. 1). RCM permitted the observation of cytoplasmic details and extracellular matrix, whereas FCM highlighted nuclei. FUCM and particularly virtual H&E, resulted in an improved image for diagnosis. Especially important was the fact that sample preparation for FUCM did not affect the subsequent quality of formalin fixed histopathological sections. However, AO immersion interferes with the examination of renal tissue under immunofluorescence (data not shown). DNA and RNA quality assessed in a CFM-imaged sample showed no differences compared with an immediately frozen control.

Characterization of normal structures in renal biopsy

The renal architecture was easily identified in ex vivo CM with distinction of the cortex and medulla, as well as the normal components of the cortex: glomeruli, tubules, blood vessels and interstitium (Fig. 2). The morphological evaluation with virtual H&E was better than evaluation using reflectance or fluorescence mode alone. Our data indicate that the pathologists were able to recognize histopathological

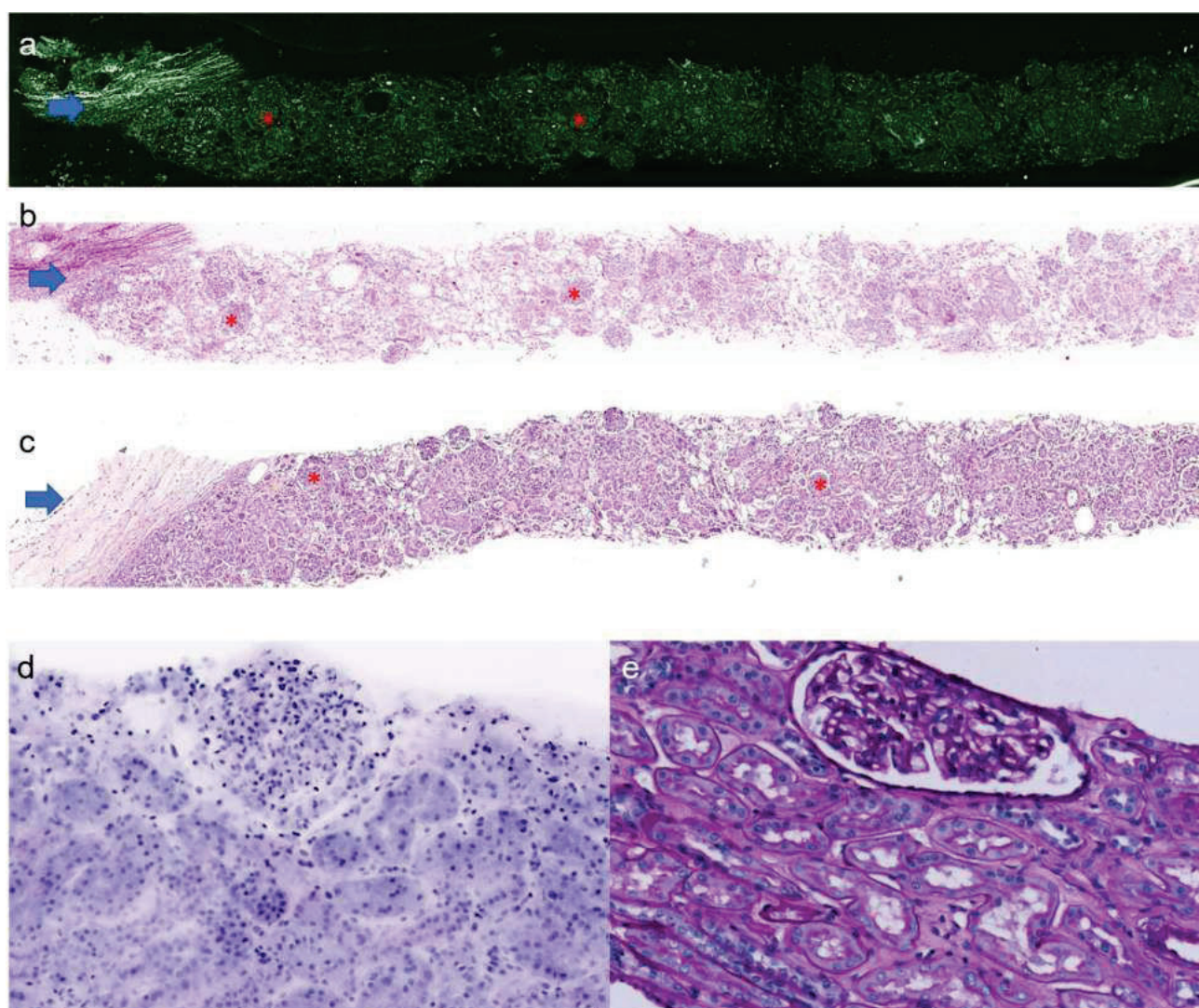


Fig. 1 Needle biopsy: FUCM image (a) and virtual H&E (b) allow recognition of the tissue similar to the image of H&E tissue 10X (c). Kidney cortex identifiable as such by the numerous renal corpuscles (some of them marked by red asterisks). Renal capsule is also vis-

ible (blue arrow). Cortex exhibits a normal glomerulus and trophic closely packed tubules [virtual H&E (d) and PAS tissue 400× (e)]. (Color figure online)

features using FUCM or virtual H&E with a high degree of agreement between virtual confocal imaging versus conventional histological slides. Table 1 describes the performance of ex vivo CM versus conventional microscopy.

Identification of pathological renal findings

Ex vivo CM facilitated the identification of sclerotic glomeruli, tubular atrophy, interstitial fibrosis foci, and interstitial inflammation (Fig. 3). Global glomerulosclerosis was recognized as extracellular matrix deposition with capillary luminal obliteration and decrease in tuft cell numbers. Expansion of the urinary space, due to the shrinkage of the tuft, and periglomerular fibrosis were also observed. Chronic vascular

injuries such as arteriolar hyalinosis and intimal thickening of the arteries were readily identified (Fig. 4).

Ex vivo CM did not interfere with posterior routine examination of renal biopsy.

Routine histochemical stains used to evaluate kidney biopsy, e.g., periodic acid-Schiff (PAS), periodic acid-methenamine silver (Jones), and Masson's trichrome, showed no changes due to the CM imaging process (Figs. 1, 3). Immunohistochemical staining using nuclear and membrane antigens displayed high quality results.

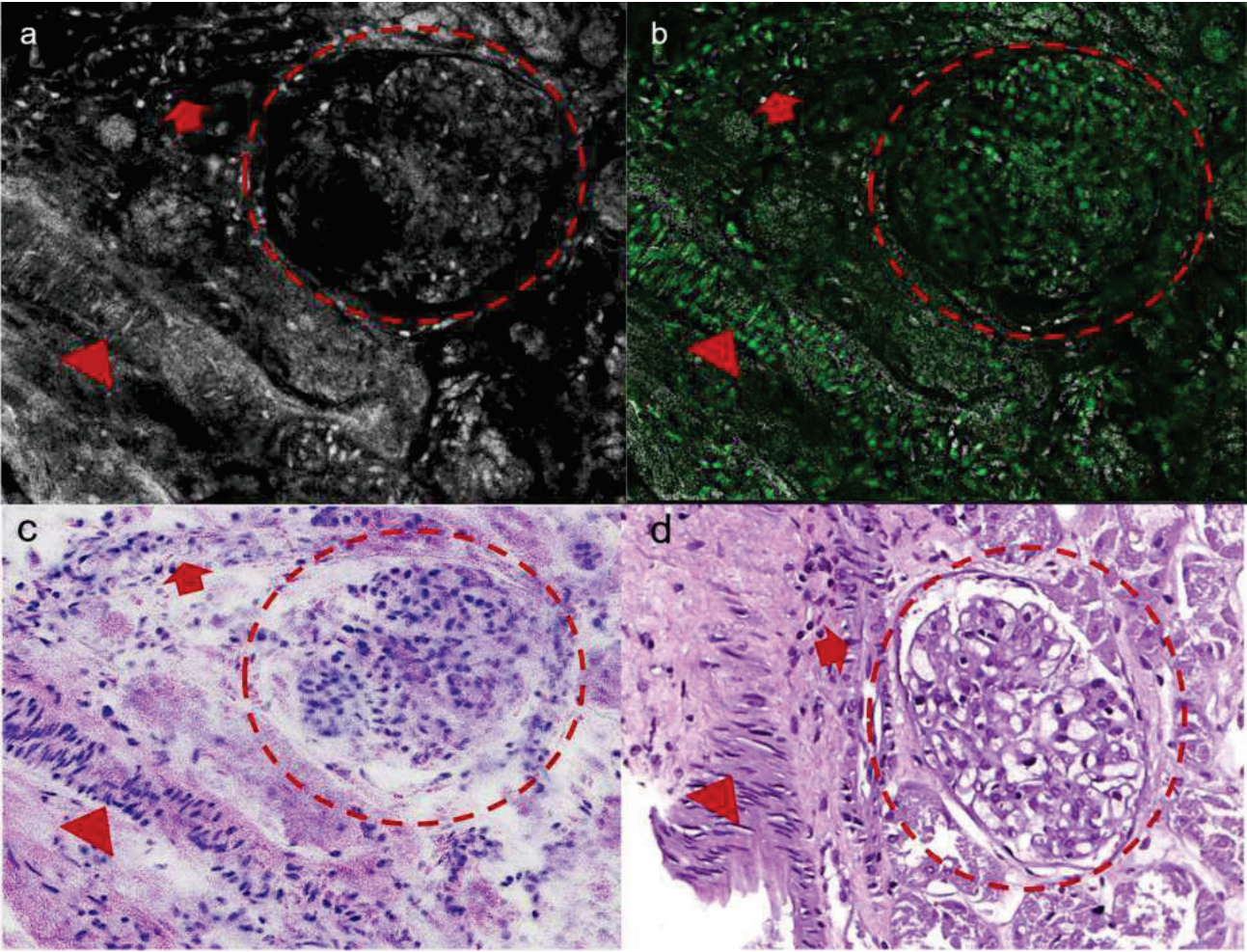


Fig. 2 Confocal microscopy imaging of normal glomerulus with a well-defined Bowman's capsule, conserved urinary space and regular cellular distribution (red circle). Muscular layer of an interlobular artery (red arrowhead) and a normal arteriole (red arrow), are also identified [RCM (**a**), FUCM (**b**), virtual H&E (**c**) and H&E tissue 400× (**d**)]. (Color figure online)

Table 1 Concordance between conventional histology and EV confocal microscopy

Tissue compartment	Convencional histology (N=24)	Ex vivo confocal imaging (N=24)	Statistic
Cortex and medulla (N)	8	8	Kappa=1
Cortex only (N)	13	13	Kappa=1
Medulla only (N)	3	3	Kappa=1
Mean number of glomeruli (range)	10 (1–22)	9 (2–23)	Lin=0.97 (0.94–0.98)
Average global glomerulosclerosis (N)	0.83	0.77	Kappa=0.6
Interstitial fibrosis (N)	7	7	Kappa=1
Tubular atrophy (N)	8	8	Kappa=1
Interstitial inflammation (N)	6	5	Kappa=0.88
Arcuate or interlobular arteries (N)	15	16	Kappa=0.87
Arterioles (N)	21	21	Kappa=1

EV ex vivo

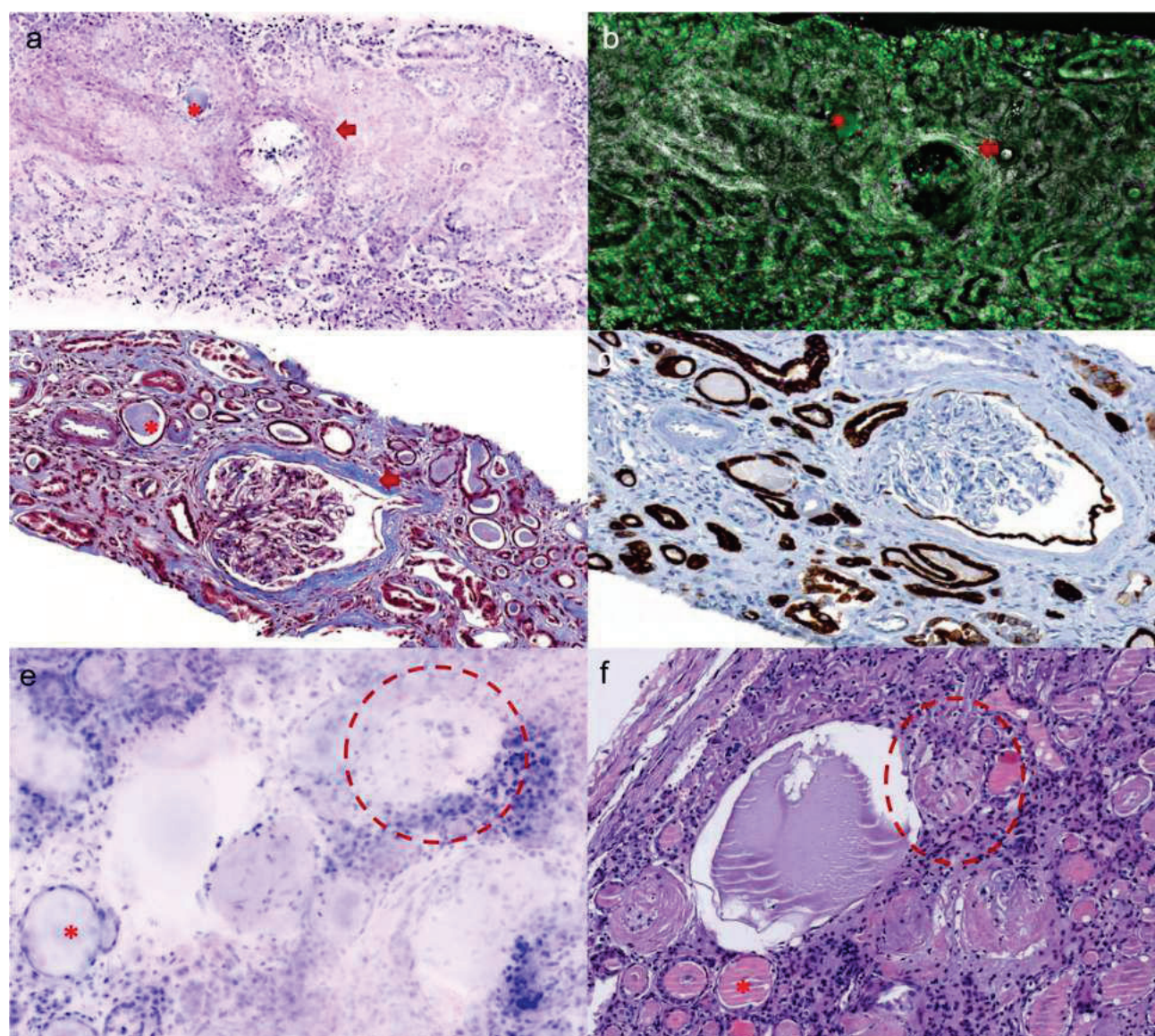


Fig. 3 Chronic lesions can be evaluated with virtual H&E (a) and FUCM (b). Examples of tubular atrophy in a thyroidization pattern, with small round tubules and uniform intratubular casts (red asterisk), associated with interstitial fibrosis. Comparison with Masson

trichrome 200× (c), and immunohistochemistry for CK7 200× (d), is displayed. In addition, periglomerular fibrosis (red arrow) and global glomerulosclerosis (red circle) were identified [virtual H&E (e) and H&E tissue 200× (f)]. (Color figure online)

Discussion

This prospective observational study in a set of postmortem renal biopsies illustrates the possibilities offered by ex vivo CM. This technique allows cellular resolution imaging of fresh renal biopsies, without freezing tissue or using standard processing procedures. Virtual H&E images were obtained in an average of three minutes, with no loss of tissue, morphological detail, or molecular integrity.

The FUCM method has the potential to restructure the clinical workflow in renal histopathology and raises possibilities for implementation of deep-learning approaches.

Most of the current cohorts of CM focus on oncopathology [14–18] and currently, there are no studies available in nephropathology. Previously, Krishnamurthy et al. performed ex vivo CM evaluation of surgical resections of kidney tumors, aiming to identify the lesion as either a benign tumor or renal carcinoma [12].

The FUCM platform implemented in our study was easy to use. This approach combines RCM and FCM modes, resulting in sections of the tissues at resolutions similar to those of light microscopy and obtaining virtual H&E staining [19]. The quality of the images allows categorization of the glomerular, vascular and tubulo-interstitial

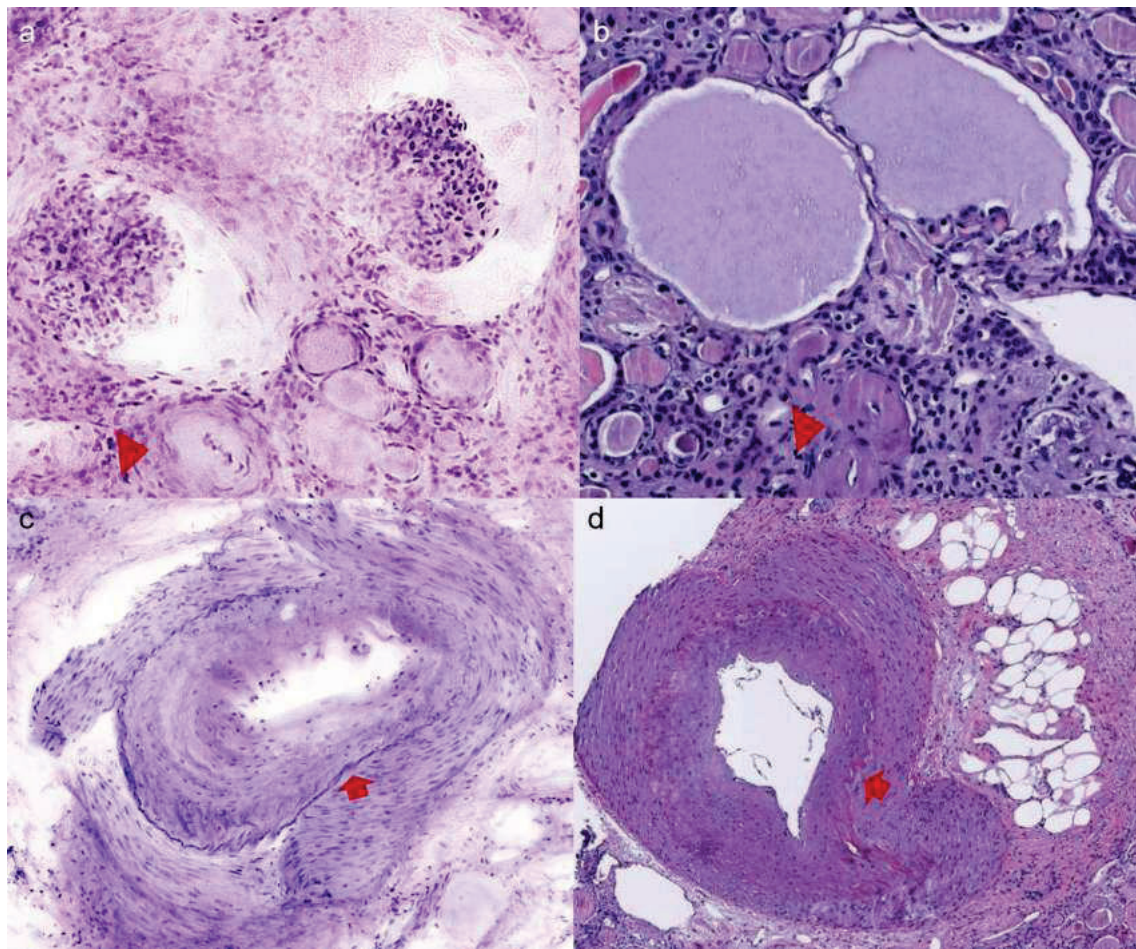


Fig. 4 Vascular lesions such as arteriolar hyalinosis (red arrow head) and arterial intimal thickening (red arrow), were also recognized [virtual H&E (a and c) and H&E tissue 400× (b and d)]. (Color figure online)

compartments. The results of this study indicate that ex vivo CM is a promising approach for the prompt examination of renal biopsies aiming to characterize fibrosis and inflammation in non-neoplastic kidney diseases [20]. This technique has potential applications not only in the evaluation of specimen adequacy at the time of renal biopsy, but also to optimize the quality assurance of the renal tissues for biobanking. Furthermore, sample preparation and processing is an inexpensive procedure that afterwards, allows complete optical microscopy assessment and molecular analysis in the same tissue.

The implementation of ex vivo CM of the renal biopsy may provide a feasible and straightforward way for standardization of quantitative image analysis, favoring the development of robust digital repositories in nephropathology.

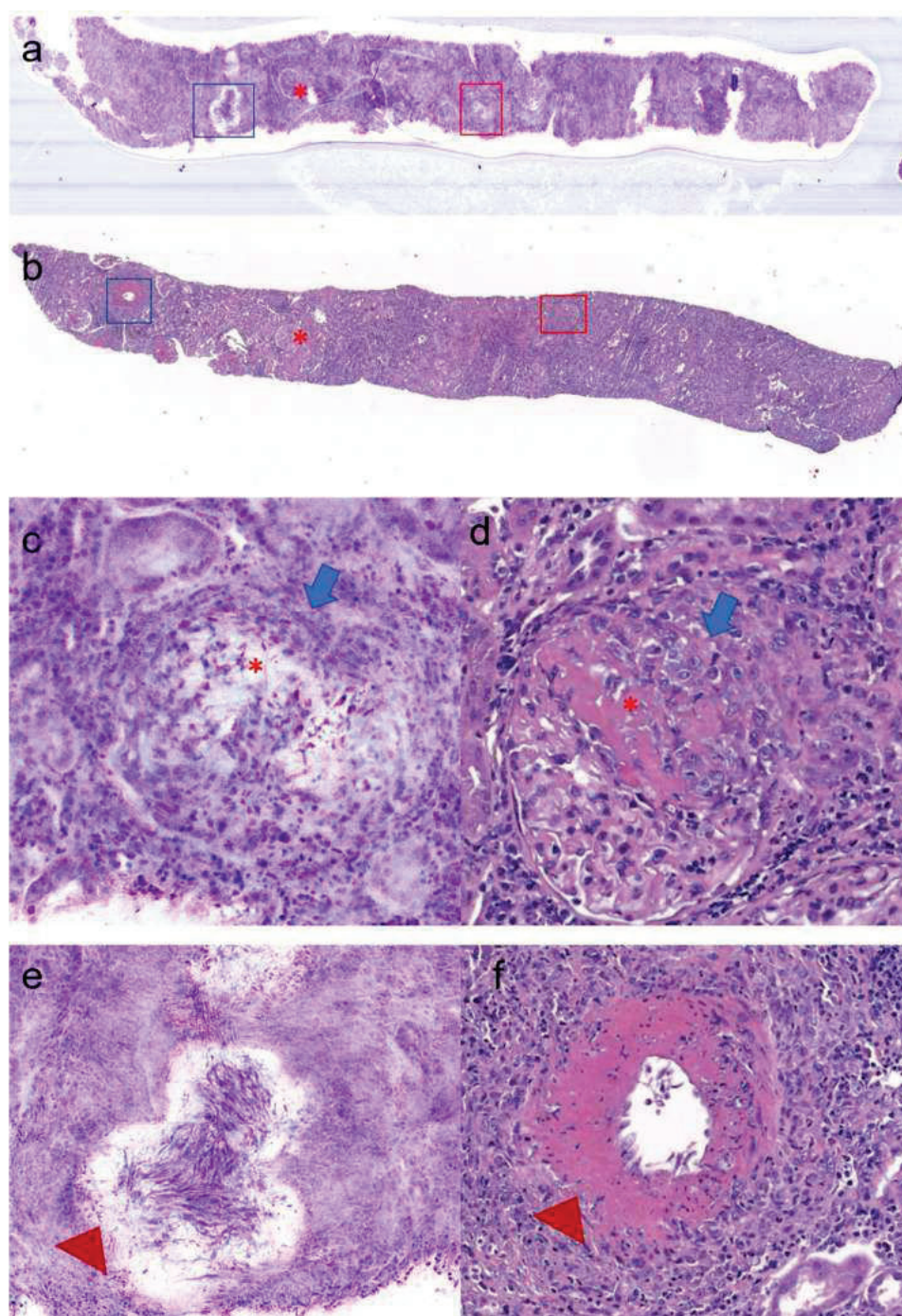
Moreover, our results confirmed the potential role of ex vivo CM to establish a rapid score of chronic damage in the renal biopsy. Tubular atrophy, interstitial fibrosis, glomerulosclerosis, and chronic vascular lesions were clearly identified with an excellent correlation with conventional

light microscopy. Out of the scope of the paper and in order to glimpse the potential of this technical approach in a specific renal disease, Fig. 5 depicts the case of ANCA-associated glomerulonephritis analyzed by virtual H&E and conventional H&E, displaying comparable findings.

Virtual H&E may optimize the frozen section analysis, which is the most commonly used procedure for rapid examination of renal tissue from potential cadaver donors in renal transplantation [21, 22]. The procedure of freezing and cutting the frozen tissue block in a cryotome and subsequently staining it requires technical skills; and it is operator dependent, adding variability. It is remarkable that the ex vivo CM technique entails minimal sample preparation and prevents unnecessary loss of tissue.

Ex vivo CM has some technical limitations. AO immersion interferes with the examination of renal tissue under immunofluorescence, but this analysis is usually performed in a different renal cylinder than that used for light microscopy. Furthermore, horizontal pressure applied to the tissue may be uneven, with portions of the renal biopsy not adhering to

Fig. 5 ANCA-associated glomerulonephritis and vasculitis, needle biopsy: virtual H&E (**a**) and H&E tissue 10× (**b**) display comparable findings. Normal (red asterisk) and abnormal (red square boxes) glomeruli, as well as abnormal vessels (blue square boxes). Inset abnormal glomerulus with cellular crescents (blue arrow) and necrosis (red asterisk) and necrotizing vasculitis were identified in virtual H&E (**c** and **e** respectively) and H&E tissue 400× (**d** and **f**, respectively). (Color figure online)



the histopathology slide. This can result in blurred scanned images. Achieving proper and uniform pressure of the tissue while avoiding crushing the artifact deserves special attention.

In conclusion, the ease and speed of grayscale and fluorescence image acquisition, together with the quality of images obtained with this fusion mode of ex vivo CM approach, suggest that this technique shows promise for use in renal medicine practice, optimizing the information

that is already obtained from conventional techniques of the pathology for native and allograft kidneys.

These promising results need further validation with multiple readers in multicenter studies to confirm that the fusion mode technique can generate images that allow nephropathologists to recognize the whole spectrum of renal patterns of lesions in optical sections through thick, fresh tissues.

Acknowledgements CERCA Program / Generalitat de Catalunya

Author contributions AGH, LFQ, and JM designed the study; JM, SP and LFQ obtained funding; JZV, JPA and AGH carried out experiments. AGH, MS, GP, JPA, JZV and LFQ analyzed the data; AGH and MS made the figures; AGH, LFQ, JM, MB, JZV, SP, JPA drafted and revised the paper; all authors approved the final version of the manuscript.

Funding This work was supported by: “Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)” and “Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)” (PI17/00080). Role of digital pathology and nuclear magnetic resonance in the early detection of interstitial fibrosis in chronic kidney disease. “Recent development of the technology within a European Union-funded program (DIAGNOPTICS, “Diagnosis of skin cancer using optics”. Grant agreement no: 621066) enabled to produce a multimodal confocal device for the fast evaluation of tissue specimens Ex-vivo”. Premio Fin de Residencia Hospital Clínic Emili Letang 18_251226_PFR_2018. Role of ex vivo confocal microscopy in the evaluation of the renal biopsy.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest No author has any conflict of interest. The information presented in this paper has not been published previously in whole or in part.

Ethical approval The study was approved by the ethics committee of the Hospital Clinic, Barcelona and was conducted in accordance with the precepts of the Helsinki Declaration. All the data were handled anonymously.

References

- Fiorentino M, Bolignano D, Tesar V et al (2016) Renal biopsy in 2015—from epidemiology to evidence-based indications. *Am J Nephrol* 43:1–19. <https://doi.org/10.1159/000444026>
- D’Agati VD, Cohen DJ (2003) Preimplantation renal biopsy: structure does predict function. *Transplantation* 75:264–266. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000045218.25209.af>
- Welker M-W, Weiler N, Bechstein WO et al (2019) Key role of renal biopsy in management of progressive chronic kidney disease in liver graft recipients. *J Nephrol* 32:129–137. <https://doi.org/10.1007/s40620-018-0506-2>
- Richards NT, Darby S, Howie AJ et al (1994) Knowledge of renal histology alters patient management in over 40% of cases. *Nephrol Dial Transpl* 9:1255–1259
- Ragazzi M, Longo C, Piana S (2016) Ex Vivo (fluorescence) confocal microscopy in surgical pathology: state of the art. *Adv Anat Pathol* 23:159–169. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000114>
- Gareau DS, Jeon H, Nehal KS, Rajadhyaksha M (2012) Rapid screening of cancer margins in tissue with multimodal confocal microscopy. *J Surg Res* 178:533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.05.059>
- Cinotti E, Perrot J-L, Labeille B et al (2015) Handheld reflectance confocal microscopy for the diagnosis of conjunctival tumors. *Am J Ophthalmol* 159:324–33.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2014.10.031>
- Alarcon I, Carrera C, Palou J et al (2014) Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. *Br J Dermatol* 170:802–808. <https://doi.org/10.1111/bjd.12678>
- Combalia M, Pérez-Anker J, García-Herrera A et al (2019) Digitally stained confocal microscopy through deep learning. In: Cardoso MJ, Feragen A, Glocker B, et al. (eds) *Proceedings of the 2nd International Conference on medical imaging with deep learning*. PMLR, London, pp 121–129
- Pérez-Anker J, Ribero S, Yélaños O et al (2020) Basal cell carcinoma characterization using fusion ex vivo confocal microscopy: a promising change in conventional skin histopathology. *Br J Dermatol* 182:468–476. <https://doi.org/10.1111/bjd.18239>
- Puliatti S, Bertoni L, Pirola GM et al (2019) Ex vivo fluorescence confocal microscopy: the first application for real-time pathological examination of prostatic tissue. *BJU Int* 124:469–476. <https://doi.org/10.1111/bju.14754>
- Krishnamurthy S, Cortes A, Lopez M et al (2018) Ex vivo confocal fluorescence microscopy for rapid evaluation of tissues in surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 142:396–401. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0164-OA>
- Saco A, Diaz A, Hernandez M et al (2017) Validation of whole-slide imaging in the primary diagnosis of liver biopsies in a University Hospital. *Dig liver Dis* 49:1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.07.002>
- Giataganas P, Hughes M, Payne CJ et al (2019) Intraoperative robotic-assisted large-area high-speed microscopic imaging and intervention. *IEEE Trans Biomed Eng* 66:208–216. <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2837058>
- Yoshitake T, Giacomelli MG, Cahill LC et al (2016) Direct comparison between confocal and multiphoton microscopy for rapid histopathological evaluation of unfixed human breast tissue. *J Biomed Opt* 21:126021. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.12.126021>
- Bertoni L, Puliatti S, Reggiani Bonetti L et al (2020) Ex vivo fluorescence confocal microscopy: prostatic and periprostatic tissues atlas and evaluation of the learning curve. *Virchows Arch* 476:511–520. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02738-y>
- Forest F, Cinotti E, Yvovet V et al (2015) Ex vivo confocal microscopy imaging to identify tumor tissue on freshly removed brain sample. *J Neurooncol* 124:157–164. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1832-z>
- Eschbacher JM, Georges JF, Belykh E et al (2017) Immediate label-free ex vivo evaluation of human brain tumor biopsies with confocal reflectance microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 76:1008–1022. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx089>
- Schüürmann M, Stecher MM, Paasch U et al (2019) Evaluation of digital staining for ex vivo confocal laser scanning microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. <https://doi.org/10.1111/jdv.16085>
- Malkoç E, Maurice MJ, Akça O et al (2018) Significance of the nonneoplastic renal parenchymal findings in robotic partial nephrectomy series. *J Nephrol* 31:925–930. <https://doi.org/10.1007/s40620-018-0479-1>
- Girolami I, Gambaro G, Ghimenton C et al (2020) Pre-implantation kidney biopsy: value of the expertise in determining histological score and comparison with the whole organ on a series of discarded kidneys. *J Nephrol* 33:167–176. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00638-7>
- Liapis H, Gaut JP, Klein C et al (2017) Banff histopathological consensus criteria for preimplantation kidney biopsies. *Am J Transpl* 17:140–150. <https://doi.org/10.1111/ajt.13929>

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.2. RESUMEN ARTÍCULO 2

Introducción: La microscopía confocal *ex vivo* es una técnica que proporciona imágenes en tiempo real, de tejidos frescos incluyendo el riñón, con una resolución óptica comparable a la patología convencional. **Objetivo:** Evaluar el uso de la EVCM para el reconocimiento de los patrones básicos de lesión en nefropatología.

Métodos: Se realizó un estudio prospectivo que incluyó 48 pacientes a los que se les realizó biopsia renal por indicación médica. Solo la parte de la muestra destinada a microscopía óptica se usó para análisis de imagen con EVCM. La concordancia entre los hallazgos del estudio convencional y los observados mediante EVCM fue evaluada con el coeficiente Kappa para las variables histológicas cualitativas (categóricas) y con el coeficiente de correlación de concordancia de Lin para las variables numéricas. Los coeficientes se expresaron como estimación y un intervalo de confianza del 95 %.


Resultados: La concordancia entre la microscopía convencional y la tinción de H&E digital fue clasificada como muy buena ($\kappa = 0.88$) en la evaluación del daño tubular agudo y sustancial ($\kappa = 0.79$) en la evaluación de la fibrosis intersticial, la inflamación intersticial y las lesiones arteriales y arteriolas. La tinción de H&E digital adicionalmente, permitió la identificación de la proliferación extracapilar ($\kappa = 0.88$), la necrosis y la esclerosis segmentaria ($\kappa = 0.88$) en el compartimento glomerular,

aunque estos resultados ven limitado su impacto, si se tiene en cuenta el pequeño número de casos testados con estas alteraciones.

Conclusiones: la EVCM demostró ser efectiva en la evaluación de la mayoría de los patrones ópticos de lesión renal descritos, tanto agudos como crónicos. La facilidad para adquirir imágenes dichas lesiones, podría suponer una reestructuración del flujo de trabajo en el ámbito de la nefropatología con repercusiones en la clínica.

ORIGINAL ARTICLE

Ex vivo confocal microscopy detects basic patterns of acute and chronic lesions using fresh kidney samples

Jesús Z. Villarreal^{1,2}, Javiera Pérez-Anker^{2,3}, Susana Puig³, Marc Xipell¹, Gerard Espinosa⁴, Esther Barnadas^{5,6}, Ana B. Larque^{5,6}, J. Malveyh³, Ricard Cervera⁴, Arturo Pereira⁶, Antonio Martinez-Pozo⁵, Luis F. Quintana^{1,6}  and Adriana García-Herrera^{5,6}

¹Department of Nephrology and Renal Transplantation, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Fundación Hospital Clínic, Barcelona, Spain, ³Department of Dermatology, Melanoma Unit, Hospital Clínic de Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Barcelona, Spain, ⁴Department of Autoimmune Diseases, Reference Centre for Systemic Autoimmune Diseases of the Spanish Health System, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Pathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain and ⁶Reference Centre for Complex Glomerular Diseases of the Spanish Health System, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence to: Adriana García-Herrera; E-mail: apgarcia@clinic.cat and Luis F. Quintana; E-mail: lfquinta@clinic.cat

ABSTRACT

Background. Ex vivo confocal microscopy is a real-time technique that provides high-resolution images of fresh, non-fixed tissues, with an optical resolution comparable to conventional pathology. The objective of this study was to investigate the feasibility of using ex vivo confocal microscopy in fusion mode (FuCM) and the haematoxylin and eosin (H&E)-like digital staining that results for the analysis of basic patterns of lesion in nephropathology.

Methods. Forty-eight renal samples were scanned in a fourth-generation ex vivo confocal microscopy device. Samples were subjected to confocal microscopy imaging and were then processed using conventional pathology techniques. Concordance between the techniques was evaluated by means of the percentage of agreement and the κ index.

Results. Agreement between conventional microscopy and H&E-like digital staining was strong ($\kappa = 0.88$) in the evaluation of acute tubular damage and was substantial ($\kappa = 0.79$) in the evaluation of interstitial fibrosis, interstitial inflammation, arterial and arteriolar lesions. H&E-like digital staining also allows rapid identification of extracapillary proliferation ($\kappa = 0.88$), necrosis and segmental sclerosis ($\kappa = .88$) in the glomerular compartment, but the results reported here are limited because of the small number of cases with these glomerular findings.

Conclusions. FuCM proved to be as effective as conventional techniques in evaluating the presence of acute tubular necrosis and interstitial fibrosis changes, but in fresh tissue. The ease of acquisition of ex vivo confocal microscopy images suggests that FuCM may be useful for rapid evaluation of kidney biopsies and to restructure the clinical workflow in renal histopathology.

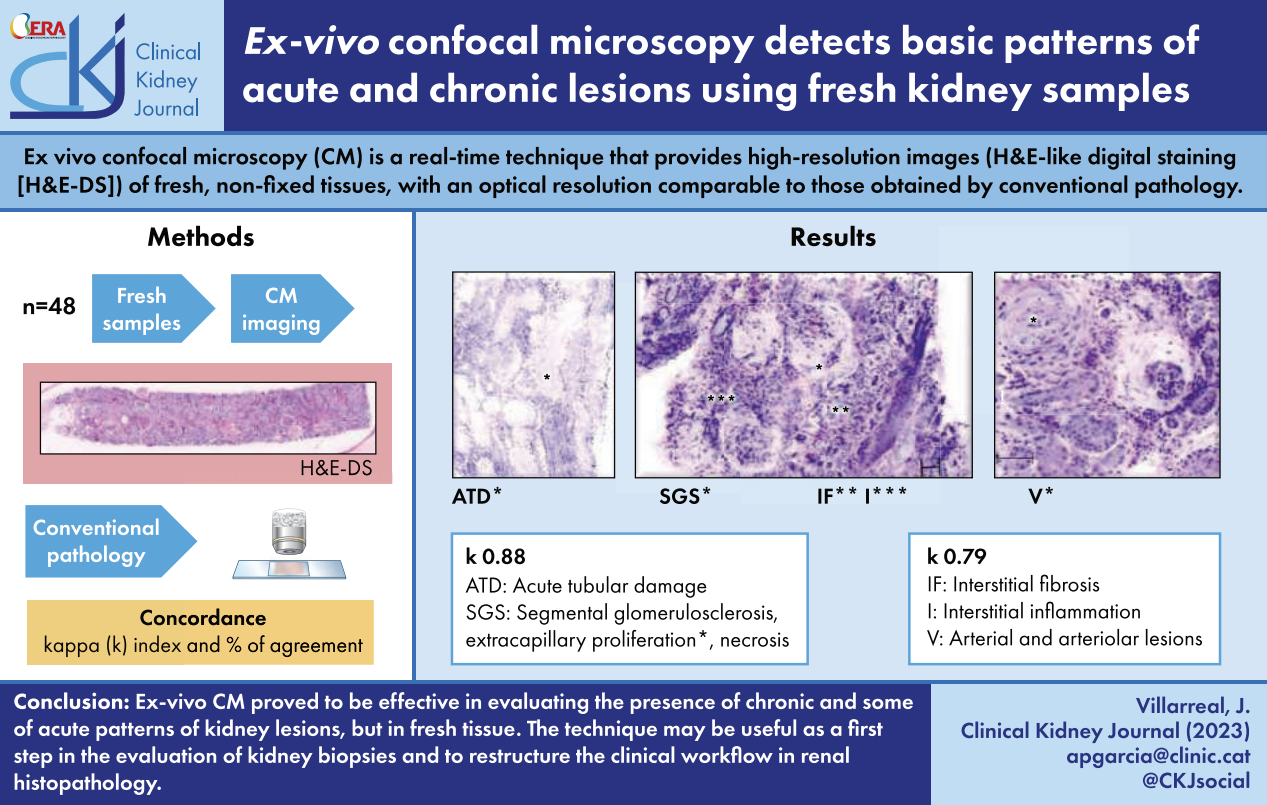
Received: 25.8.2022; Editorial decision: 5.1.2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the ERA. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

LAY SUMMARY

This study contributes to the refinement of renal biopsy analysis, showing that *ex vivo* confocal microscopy can become the first step in a hierarchical study and in the segmentation of kidney biopsy studies in renal medicine. Confocal images correlated very well with the corresponding conventional histological sections. This study opens new methods for the global improvement of renal biopsy analysis, thereby favouring the evaluation of new therapies.

GRAPHICAL ABSTRACT



the pathologist. In the present study, we aimed to generate images by *ex vivo* FuCM that allow recognition of glomerular, tubulointerstitial and vascular lesional patterns. Optical sections of thick, fresh tissues from 48 native kidneys allowed complete optical microscopy assessment and molecular analysis in the same tissue. To highlight limitations and possible applications of this technology in the diagnosis of renal non-neoplastic pathology, the confocal images were correlated with the corresponding histological sections obtained by conventional methods.

MATERIALS AND METHODS

Study sample and tissue collection

We conducted a prospective study that included 48 renal samples from patients undergoing renal biopsy for clinical indications. Tissue specimens were obtained with an automated spring-loaded biopsy device. Samples were kept moist on saline-soaked gauze and, within 5 minutes after their obtention, the tissue was divided into three portions for light microscopy (LM), immunofluorescent histology and electron microscopy. Only the portion selected for LM was used for image analysis. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic, Barcelona and was conducted in accordance with the precepts of the Helsinki Declaration. All the data were handled anonymously.

Ex vivo FuCM

Kidney tissue cylinders were immersed in acridine orange (AO) 0.6 mmol for 20 seconds, then washed in saline solution for 20 seconds, immersed in acetic acid 50% for 20 seconds and finally rinsed again in saline solution for 20 seconds. The tissue was placed in a conventional histopathology slide and covered by a coverslip to retain the specimen in the same position during the scanning.

Confocal mosaics were acquired using the fourth-generation VivaScope 2500 (MAVIG, Munich, Germany), especially designed for *ex vivo* imaging of freshly excised tissue samples. The 2500M-G4, equipped with a 38× gel immersion objective, uses two lasers with wavelengths of 488 nm (blue) and 785 nm (infrared) and has a resolution image of 1024 × 1024 pixels. AO is excited by the blue laser (FCM), whereas the infrared laser is used to generate a reflectance signal (RCM). Both the reflection and fluorescence signals are detected simultaneously and combined in real time. An integrated algorithm that is furnished with the microscope linearly combines the FCM and RCM images to form a red, green, blue (RGB) output graphic [haematoxylin and eosin (H&E)-like digital staining], which resembles H&E-stained pathology slides, assigning a purple colour to FCM and a pink colour to RCM.

Formalin-fixed paraffin-embedded analyses

After *ex vivo* CM, the tissue was immediately fixed in 10% neutral-buffered formalin, subjected to routine processing and embedded in paraffin wax to generate tissue blocks for comparison with standard pathologic analysis [10]. All kidney biopsies were evaluated by two nephropathologist (A.G.H., A.L.) blinded to clinical data.

Statistical methods

For each kidney biopsy, the following data were collected: number of glomeruli, number of arteries, sample's adequacy

(adequate, >10 glomeruli and >2 arteries; marginal, 7–9 glomeruli and ≥1 artery; suboptimal, 1–6 glomeruli and ≥1 artery; inadequate, failing to meet at least the suboptimal criteria), number of globally sclerosed glomeruli, number of normal glomeruli and the presence of segmental sclerosis, crescents, endocapillary or mesangial hypercellularity, necrosis, increased mesangial matrix, acute tubular damage and arterial and arteriolar damage. Tubular atrophy, interstitial fibrosis and interstitial inflammation were semiquantified as follows: absence 0%, mild <25%, moderate 25–50% and severe >50%. Continuous and ordered variables were summarized as the median and interquartile range (IQR), whereas categorical variables were represented by frequencies and proportions. Concordance between conventional microscopy and FuCM in the assessment of histopathological lesions was evaluated by means of the percentage of agreement and the κ index [11]. The κ index is thought to be more reliable than the mere percentage of agreement because it considers the possibility of agreement occurring by chance. Since the κ index increases with the number of categories of the variable, we collapsed features with more than two categories into binary variables to make the κ index values comparable across variables. *P*-values of the κ index are usually not considered as a measure of concordance. Instead, the degree of concordance is often categorized as slight ($\kappa = 0.00$ – 0.20), fair ($\kappa = 0.21$ – 0.40), moderate ($\kappa = 0.41$ – 0.60), substantial ($\kappa = 0.61$ – 0.80) and strong ($\kappa = 0.81$ – 1.00). All statistical calculations were performed with Stata version 14 (StataCorp, College Station, TX, USA).

RESULTS

Clinical data

The median age of the 48 patients was 53.5 years (IQR 36–67.5) and 28 (58%) were females. In this cohort there were 16 patients with hypertension (33.3%), 1 with type 2 diabetes mellitus (2%) and 6 had both diseases (12.5%). Table 1 summarizes the main patient data at the time of the renal biopsy. Renal biopsy allowed us to confirm a diagnosis in 88% of the patients,

Table 1: Clinical characteristics of 48 patients with kidney diseases whose renal biopsies were evaluated for concordance between standard optical microscopy and confocal microscopy.

Age (years), median (IQR)	53.5 (36–77.5)
Sex (female/male), n (%)	28 (58)/20 (42)
Comorbidities, n (%)	
Arterial hypertension	16 (33)
Diabetes mellitus	1 (2)
Both	6 (12)
Serum creatinine (mg/dl), median (IQR)	1.1 (0.7–1.7)
>1.3, n (%)	20 (42)
Glomerular filtration rate (ml/24 h/1.73 m ²), median (IQR)	64 (38–95)
Proteinuria (mg/24 h), median (IQR)	1701 (503–5500)
>1000, n (%)	27 (56)
Abnormal sediment, n (%)	
Haematuria	10 (21)
Leukocyturia	6 (12)
Both	8 (17)
Stage of chronic kidney disease, n (%)	
Stage 1	14 (29)
Stage 2	21 (44)
Stage 3	13 (27)

Table 2: Agreement between confocal microscopy and conventional microscopy in the evaluation of histopathological findings in renal biopsy specimens.

Optical microscopy	Confocal microscopy, n		Agreement (%)	Expected agreement (%) ^a	κ index
	Yes	No			
Glomerular sclerosis					
Yes ($\geq 25\%$ glomeruli)	13	0	64.6	44.3	0.36
No ($< 25\%$ glomeruli)	17	18			
Segmental sclerosis					
Yes	10	0	95.8	64.6	0.88
No	2	36			
Increased mesangial matrix					
Yes	6	6	75.6	61.9	0.36
No	5	28			
Endocapillary-mesangial hypercellularity					
Yes	8	6	60.0	52.0	0.17
No	11	20			
Necrosis					
Yes	1	3	91.5	87.9	0.29
No	1	42			
Extracapillary proliferation					
Yes	4	0	98.0	83.0	0.88
No	1	43			
Acute tubular damage					
Yes	4	0	98.0	83.0	0.88
No	1	43			
Tubular atrophy					
Yes	30	0	64.6	62.0	0.07
No	17	1			
Interstitial fibrosis/oedema					
Yes	24	6	87.5	50.0	0.75
No	0	18			
Interstitial inflammation					
Yes	23	6	87.5	49.6	0.75
No	0	19			
Arterial lesions					
Yes	17	1	81.4	49.0	0.63
No	7	18			
Arteriolar lesions					
Yes	29	0	87.5	54.8	0.72
No	6	13			

^aAgreement expected merely by chance.

including lupus nephritis in 12 (25%), immunoglobulin A nephropathy in 5 (10%) and amyloidosis in 4 (8%). Other diagnoses were membranous glomerulopathy (6%), anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis (6%), minimal change disease (6%), diabetic nephropathy (4%), thrombotic microangiopathy (4%), chronic tubulointerstitial nephritis (4%), nephroangiosclerosis (2%), immune complex membranoproliferative glomerulonephritis (2%) and monoclonal immunoglobulin deposition disease (2%).

Conventional microscopy versus FuCM

The number of glomeruli was significantly greater in specimens evaluated by conventional microscopy than in those evaluated by FuCM [median 13.5 (IQR 8–18.5) versus 8 (5–14), respectively; $P = .03$]. In contrast, the number of evaluable arteries and the identification of arterioles was quite similar between both types of specimens (median of 1 and 1.5 arteries per specimen and

19 and 20 specimens with arterioles in conventional microscopy and FuCM, respectively).

The specimen adequacy for histopathological examination was judged as adequate in 24 samples evaluated by conventional microscopy and 15 evaluated by FuCM, while 22 in conventional microscopy and 25 in FuCM were marginal or suboptimal. The median number of glomeruli in marginal or suboptimal specimens was 9 (IQR 8–15) in conventional microscopy and 8.5 (IQR 7–9) in FuCM.

Histopathological findings

Table 2 summarizes the main histopathological findings identified by conventional microscopy and FuCM and the degree of agreement between both methods. Figs. 1 and 2 show representative glomerular and tubulointerstitial lesions, respectively, and Supplementary Table 1 illustrates the correlation between optical microscopy and FuCM in evaluating the disaggregated semi-quantitative score of tubulointerstitial lesions.

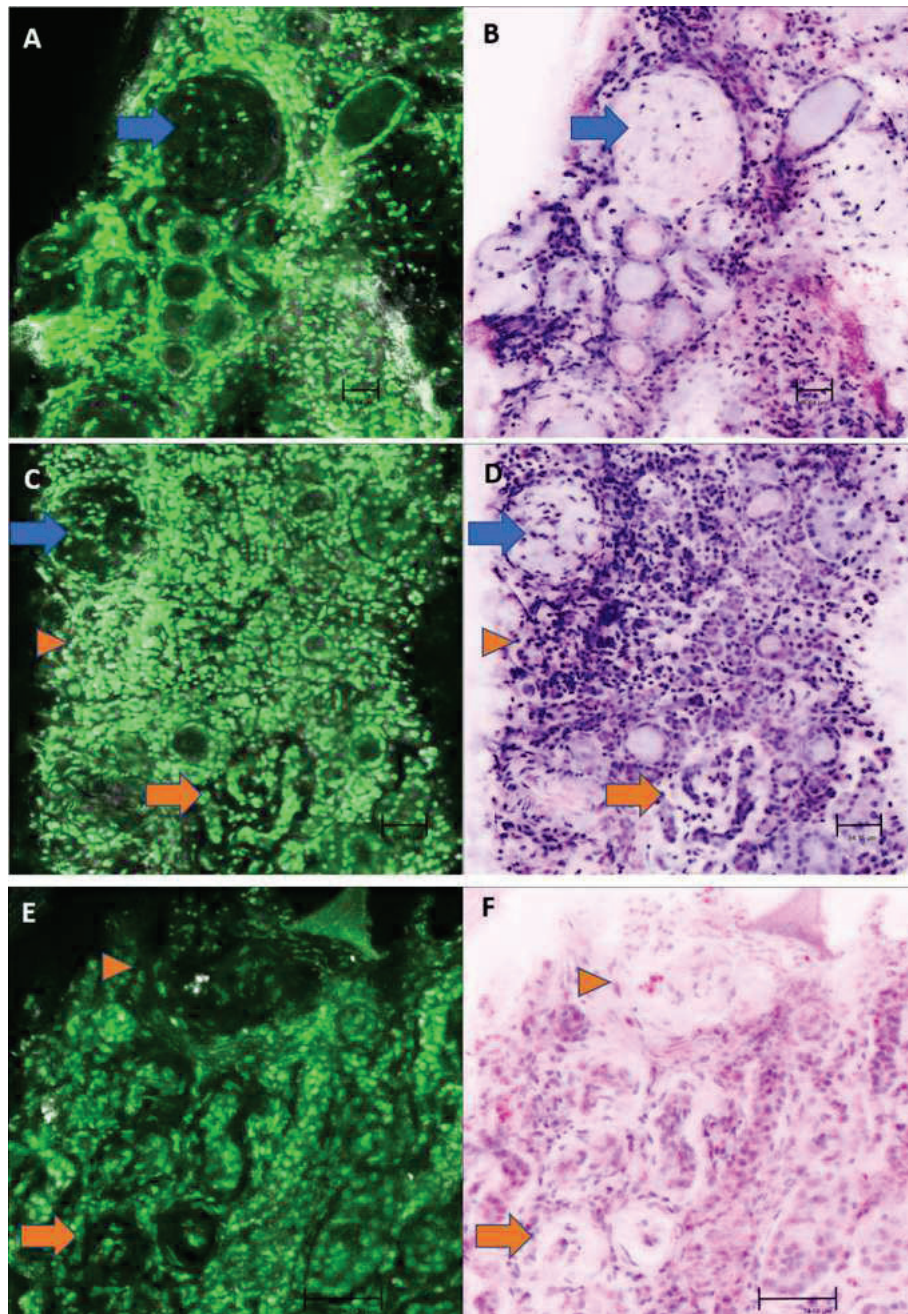


Figure 1: Morphological patterns of renal lesion identified with FuCM (left panel) and H&E-like digital staining (right panel): global glomerulosclerosis (blue arrows, A–D), interstitial fibrosis (orange arrows, C–F), interstitial inflammation (orange arrowheads, C and D), arteriolar hyalinosis (orange arrowheads, E and F).

The percentage of agreement was >85% in the evaluation of extracapillary proliferation, segmental sclerosis, acute tubular damage, interstitial fibrosis–oedema, interstitial inflammation and arteriolar lesions. When concordance was evaluated by the κ index, agreement between conventional microscopy and FuCM was strong for extracapillary proliferation, segmental sclerosis and acute tubular damage. Agreement was substantial in the evaluation of interstitial fibrosis, interstitial inflammation and arterial and arteriolar lesions.

Concordance was fair ($\kappa = 0.21$ – 0.40) for glomerular sclerosis, increased mesangial matrix and necrosis. Regarding the finding of mesangial expansion in FuCM, it is worth noting that it was

found in all four cases of renal amyloidosis and was characterized by its weak purple fluorescent appearance (Fig. 3). In contrast, concordance was only slight ($\kappa \leq 0.20$) in the evaluation of endocapillary and mesangial hypercellularity and tubular atrophy. Fig. 4 presents the fraction of agreement and the κ index for each histopathological feature.

DISCUSSION

Characterization of the histological pattern of injury in renal biopsy constitutes the cornerstone in determining the mechanism of injury and establishes a specific therapy in renal

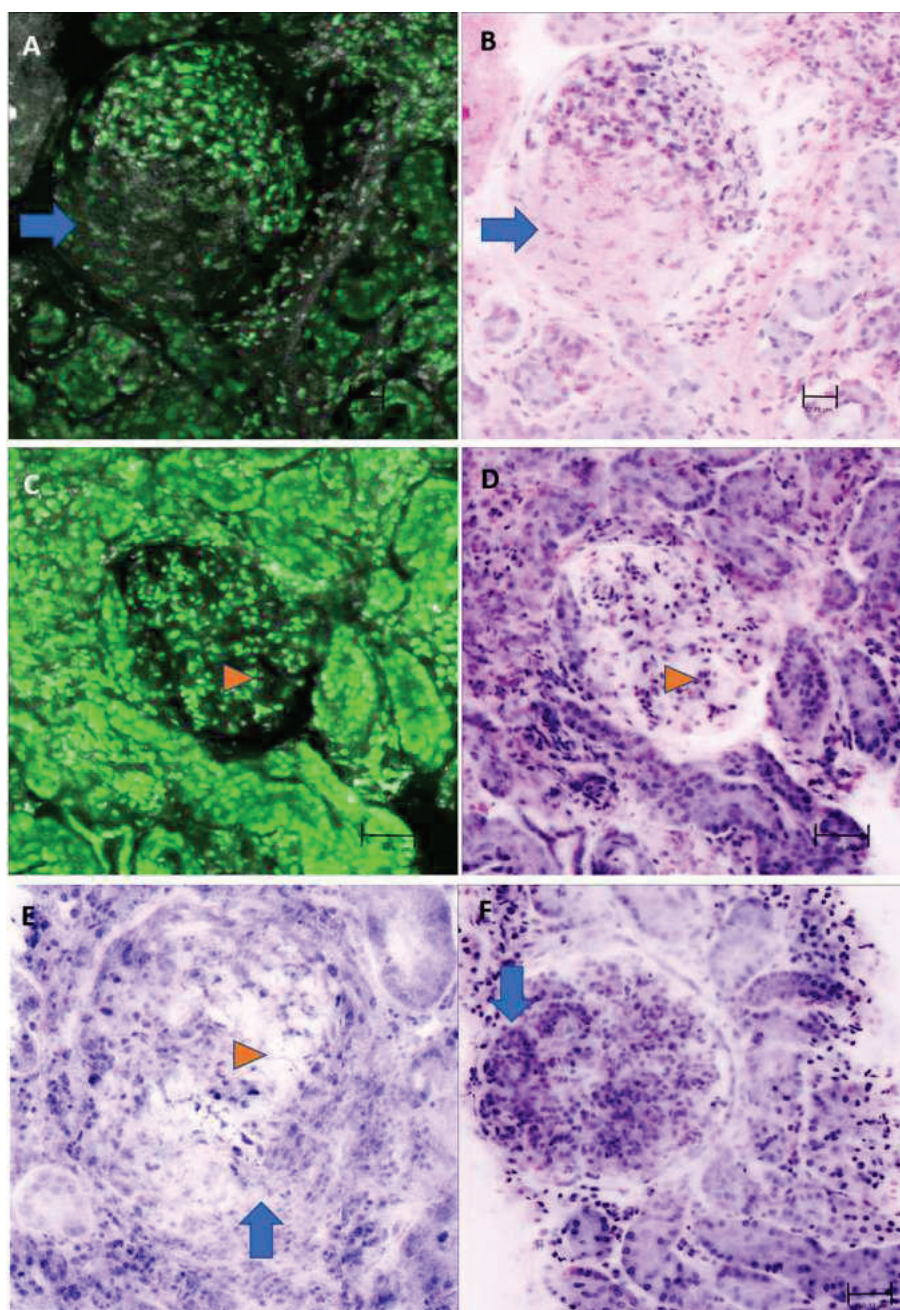


Figure 2: Glomerular lesions recognised with FuCM/H&E-like digital staining: segmental glomerulosclerosis (blue arrows, A and B), mesangial matrix expansion (orange arrowheads, C and D), necrosis and cellular crescent (orange arrowhead and blue arrow, respectively, E), segmental hypercellularity (blue arrow, F).

medicine. The introduction of renal biopsy in clinical practice was one of the founding elements of nephrology as a medical specialty. However, the development and application of new molecular biology techniques in renal tissue has not developed at the same speed as other aspects of the specialty: the scarcity of the material obtained during the biopsy and the need to fix the tissue for later analysis hinders the development of molecular approaches that require fresh tissue, such as omics techniques and subsequent *in silico* models.

The FuCM device has been extensively tested for evaluating specimens in oncopathology [12–14]. The feasibility of using FuCM for analysis of non-neoplastic kidney biopsies, includ-

ing molecular studies in the same tissue, has also been demonstrated recently [9].

Herein we describe the correlation between conventional microscopy and FuCM using native kidney specimens from clinical practice and with diverse pathological origins. There are several major findings in this study. First, FuCM is a microscopic approach with an ability to establish the adequacy of the sample that is not inferior to that of conventional microscopy in routine clinical practice [15]. Recent results from our group demonstrated that processing of the sample for FuCM does not alter the tissue for future molecular studies [9]. Therefore, these findings favour the use of FuCM/H&E-like digital staining as the first

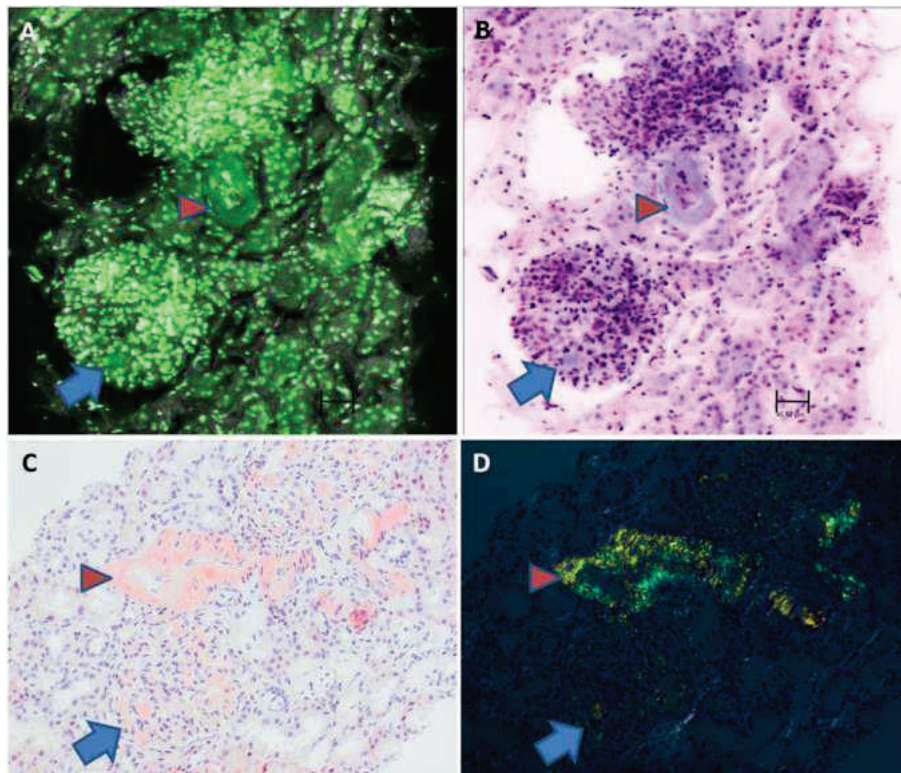


Figure 3: Amyloidosis with glomerular and vascular involvement. Amyloid displays (A) a weak green signal on FuCM and a (B) bluish colour on H&E-like digital staining. Glomerular (blue arrow) and vascular involvement (orange arrowhead) by amyloid deposition was confirmed by (C) Congo red stain under polarized light that (D) showed apple green birefringence.

method to establish the suitability of the material and to optimize the quality of the targeted tissue in performing molecular biology techniques.

Second, FuCM proved to be as effective as conventional techniques in evaluating the presence of acute tubular necrosis and interstitial fibrosis changes, but in fresh tissue. Persistent inflammation of the renal parenchyma leads to interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA), the key contributor to the progression of chronic kidney disease (CKD) [16, 17]. This pathological process is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix proteins that result in the loss of architecture and organ function. Both tubulointerstitial inflammation and IFTA strongly correlate with poor renal outcomes in a diverse group of nephropathies, regardless of the extent of glomerular damage. Moreover, IFTA has been shown to be an independent risk factor for both end-stage renal disease (ESRD) and death [18–21]. Therefore it is essential to develop a reliable approach that predicts which patients are most likely to develop CKD so that appropriate interventions can be adopted before ESRD is established [22, 23].

Tubules and interstitium are the main component of the renal parenchyma and, for this reason, their representation in a biopsy is more uniform compared with glomeruli. The findings reported in this work add quality to the global analysis of tubulointerstitial lesions, which are so important in predicting the risk of CKD in the long term. They would facilitate the evaluation of the potential benefits of new nephroprotective treatments, such as sodium–glucose co-transporter 2 inhibitor or glucagon-like peptide-1 agonists [24–26], the use of molecular techniques in various kidney pathologies or the favouring of deep-learning

approaches and standardization of quantitative image analysis of interstitial fibrosis.

Third, FuCM allows rapid identification of extracapillary proliferation, necrosis and segmental sclerosis in the glomerular compartment, but the results reported here are limited because of the small number of cases with these glomerular lesions. However, these results also position this technique as a future useful tool in the evaluation of patients with systemic disease-associated glomerulopathies such as ANCA vasculitis or systemic lupus erythematosus, which require urgent treatment with steroid pulses. Evaluation of the suitability of treatments such as plasma exchange, which represents a clinical emergency scenario in renal medicine, could be another practical use of FuCM.

Finally, it may also be useful for the quick evaluation of suspected renal amyloidosis, allowing very rapid screening of suggestive lesions. Furthermore, it may aid in the orientation of subsequent techniques, such as immunohistochemistry or mass spectrometry for amyloid type determination.

These capabilities, together with the rapid acquisition of images, could be very useful in the analysis of renal allografts before implantation and should be a subject of future prospective studies.

The ease of acquisition of digital images of quality within 5 minutes, together with the strengths of the technique previously exposed, demonstrate the suitability of FuCM for real-time kidney tissue evaluation in clinical practice. The results reported here confirm the role of FuCM as a microscopy approach that restructures clinical workflow in renal histopathology and raises possibilities for implementation of virtual

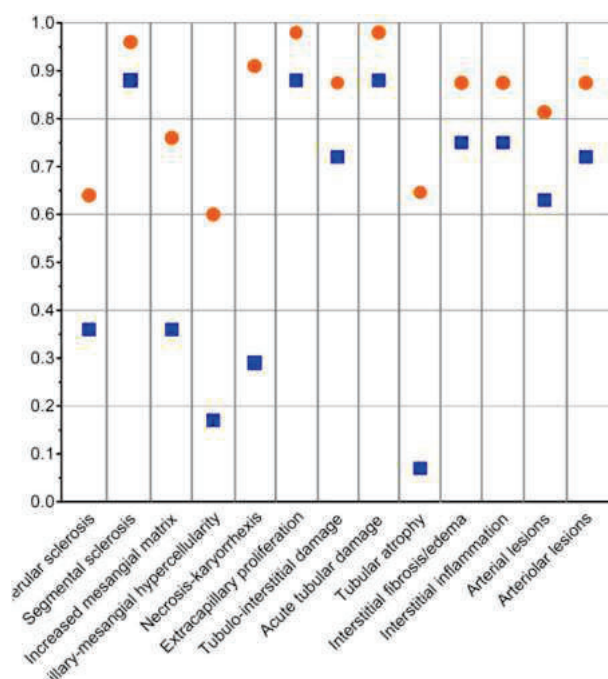


Figure 4: Agreement fraction (orange circles) and κ index (blue squares) for concordance between conventional microscopy and FuCM in the evaluation of histopathological findings in renal biopsies from 48 patients with kidney disease.

analysis in nephropathology, a subspecialty of pathology not available in many centres due to the very restricted number of experts in the field. Moreover, this approach favours the development of digital repositories and opens the way to a hierarchical processing of renal biopsies that keeps tissue viable for successful molecular studies.

Some limitations should be acknowledged. First, despite the ease of FuCM image acquisition, the analysis requires specific training of the nephropathologist. Second, these images correspond to one level of cut, compared with multiple serial sections recommended for the study of kidney biopsies. This issue could explain the fair concordance between FuCM and conventional microscopy in evaluation of global sclerosis. Finally, as images have $<5.0 \mu\text{m}$ at the centre of the field of view, evaluation of features such as endocapillary and mesangial hypercellularity is restricted.

Despite these limitations, this study further contributes to the refinement of renal biopsy analysis, showing that FuCM may become the first step in a hierarchical study and in the segmentation of the kidney biopsy study in renal medicine. Prospective studies that include multiple centres are warranted to confirm these findings.

In conclusion, this study opens new paths for the global improvement of renal biopsy analysis. Sufficiently diagnostically accurate readouts are feasible with FuCM/H&E-like digital staining, allowing tissue saving for molecular techniques. However, the current technology needs to overcome the limitations reported here in order to establish it as the first step in tissue analysis in nephropathology.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [ckj](https://doi.org/10.1093/ckj/skz011) online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya.

FUNDING

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Financiado por la Unión Europea—NextGenerationEU, Mecanismo para la Recuperación y la Resiliencia and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (PI17/00080).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

J.Z.V. and J.P.-A. contributed equally to this manuscript. L.F.Q. and A.G.-H. share senior authorship. J.Z.V. and J.P.-A. collected samples, carried out the experiment and wrote the manuscript with support from A.G.-H. and L.F.Q. S.P., J.M., G.E., R.C., M.X. provided technical and clinical data and reviewed the manuscript. E.B., A.B.L. and A.M.P. provided histopathological analysis and reviewed the manuscript, A.P. performed the statistical analysis and reviewed the manuscript. A.G.-H. and L.F.Q. conceived the original idea, coordinated and supervised the project.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data underlying this article are available in the article and in its online supplementary material.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

L.F.Q. reports fees from GlaxoSmithKline, Akcea, Otsuka and Alexion outside the submitted work. The remaining authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Fiorentino M, Bolignano D, Tesar V et al. Renal biopsy in 2015 – from epidemiology to evidence-based indications. *Am J Nephrol* 2016;**43**:1–19.
- Dhaun N, Bellamy C, Catran D et al. Utility of renal biopsy in the clinical management of renal disease. *Kidney Int* 2014;**85**:1039–48.
- Rovin B, Adler S, Barratt J et al. Executive summary of the KDIGO 2021 guideline for the management of glomerular diseases. *Kidney Int* 2021;**100**:753–79.
- Wyatt CM, Schlondorff D. Precision medicine comes of age in nephrology: identification of novel biomarkers and therapeutic targets for chronic kidney disease. *Kidney Int* 2016;**89**:734–37.
- Cortés, MA, Irazábal, E, García-Jerez, A et al. Impact of implementing ISO 9001:2008 standard on the Spanish Renal Research Network biobank sample transfer process. *Nefrología* 2014;**34**:552–60.
- Ragazzi M, Longo C, Piana S. Ex vivo (fluorescence) confocal microscopy in surgical pathology: state of the art. *Adv Anat Pathol* 2016;**23**:159–69.
- Krishnamurthy S, Shaw K et al. Confocal fluorescence microscopy platform suitable for rapid evaluation of small fragments of tissue in surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 2019;**143**:305–13.
- Elliott AD. Confocal microscopy: principles and modern practices. *Curr Protoc Cytom* 2020;**92**:e68.
- Villarreal JZ, Pérez-Anker J, Puig S et al. Ex vivo confocal microscopy performs real-time assessment of renal biopsy in non-neoplastic diseases. *J Nephrol* 2021;**34**:689–97.

10. Saco A, Diaz A, Hernandez M et al. Validation of whole-slide imaging in the primary diagnosis of liver biopsies in a university hospital. *Dig Liver Dis* 2017;**49**:1240–6.
11. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther* 2005;**85**:257–68.
12. Pérez-Anker J, Ribero S, Yelamos O et al. Basal cell carcinoma characterization using fusion ex vivo confocal microscopy: a promising change in conventional skin histopathology. *Br J Dermatol* 2020;**182**:468–76.
13. Puliatti S, Bertoni L, Pirola GM et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy: the first application for real-time pathological examination of prostatic tissue. *BJU Int* 2019;**124**:469–76.
14. Krishnamurthy S, Cortes A, Lopez M et al. Ex vivo confocal fluorescence microscopy for rapid evaluation of tissues in surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 2018;**142**:396–401.
15. Titze U, Sievert K-D, Titze B et al. Ex vivo fluorescence confocal microscopy in specimens of the liver: a proof-of-concept study. *Cancers* 2022;**14**:590.
16. Hoshino J, Mise K, Ueno T et al. A pathological scoring system to predict renal outcome in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2015;**41**:337–44.
17. Yu F, Wu L-H, Tan Y et al. Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kidney Int* 2010;**77**:820–9.
18. Leatherwood C, Speyer CB, Feldman CH et al. Clinical characteristics and renal prognosis associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) and vascular injury in lupus nephritis biopsies. *Semin Arthritis Rheum* 2019;**49**:396–404.
19. Londoño Jimenez A, Mowrey WB, Putterman C et al. Tubulointerstitial damage in lupus nephritis: a comparison of the factors associated with tubulointerstitial inflammation and renal scarring. *Arthritis Rheumatol* 2018;**70**:1801–6.
20. Alsuwaida AO Interstitial inflammation and long-term renal outcomes in lupus nephritis. *Lupus* 2013;**22**:1446–54.
21. Wilson PC, Kashgarian M, Moeckel G Interstitial inflammation and interstitial fibrosis and tubular atrophy predict renal survival in lupus nephritis. *Clin Kidney J* 2018;**11**:207–18.
22. Zeisberg M, Kalluri R The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 2004;**82**:175–81.
23. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM et al. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific 560 pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 1984;**25**:689–95.
24. Li J, Albajrami O, Zhuo M et al. Decision algorithm for prescribing SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists for diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2020;**15**:1678–8.
25. DeFronzo RA. Combination therapy with GLP-1 receptor agonist and SGLT2 inhibitor. *Diabetes Obes Metab* 2017;**19**:1353–62.
26. De Nicola L, Gabbai FB, Garofalo C et al. Nephroprotection by SGLT2 inhibition: back to the future? *J Clin Med* 2020;**9**:2243.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

La enfermedad renal, aguda y crónica, abarca un amplio y heterogéneo espectro de patologías, cuyas manifestaciones clínicas y bioquímicas son variables, diversas y de pronóstico incierto al momento del diagnóstico. Algunos de estos síndromes son indicativos claros de nefropatía, como el síndrome nefrótico, el síndrome nefrítico, el fracaso renal agudo y las tubulopatías, otros pueden estar relacionados con enfermedades sistémicas como la hipertensión, el lupus eritematoso sistémico o la diabetes. Por lo tanto, la caracterización detallada de cada una de las formas de presentación de la enfermedad renal es imprescindible para realizar un diagnóstico diferencial detallado y poder determinar con precisión las causas subyacentes.

La gran mayoría de las nefropatías conduce o se puede manifestar de forma tardía como enfermedad renal crónica, actualmente esta forma de presentación constituye una verdadera pandemia que padece el 10% de la población mundial; en nuestro entorno progresa a estadios avanzados predominantemente en hombres, de avanzada edad o con enfermedad cardiovascular⁷⁷, y es una de las pocas causas de enfermedades no transmisibles asociada a un ascenso de la mortalidad en las últimas dos décadas.⁷⁸ Según el Registro Español de Enfermos Renales (REER) 2021, la diabetes es la principal causa de enfermedad renal primaria, siendo responsable del 25,5% de los casos, seguida de las causas no filiadas (18%) y las enfermedades glomerulares (14,2%). Estas últimas llegan a constituir cerca del 24% de las causas de enfermedad renal en el segmento de población de entre 15 y 44 años.⁷⁹

La biopsia renal sigue siendo el estándar de oro en la evaluación de la enfermedad parenquimatosa renal, porque provee información no sólo relacionada con el diagnóstico etiológico, sino también con el pronóstico, favoreciendo un tratamiento oportuno y generando un impacto positivo en los datos de supervivencia renal.^{80,81} En el estudio de la biopsia renal se integra: (a) la información del patrón

de lesión morfológico, obtenido mediante el estudio de las secciones de tejido teñidas con diferentes técnicas histoquímicas y visualizadas mediante microscopía óptica convencional; (b) los datos relacionados con la fisiopatología, que provienen del estudio de inmunofluorescencia directa, en donde se evalúa la presencia de depósitos de cadenas pesadas y/o livianas de inmunoglobulinas, fracciones del complemento y/o fibrinógeno; y (c) hasta un 20% de los casos requieren la información adicional del estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica para precisar el diagnóstico.⁸²

Es por este motivo, que posterior a la realización de la biopsia, la muestra obtenida del tejido renal requiere la separación en tres partes para su posterior evaluación microscópica. En esta etapa debe estar presente un técnico o patólogo experimentado. Los glomérulos se pueden observar de forma directa con un microscopio de disección. La división de toda la muestra asegurará la colocación adecuada del tejido en los tres medios. Posteriormente la evaluación patológica integral de la muestra se realizará bajo microscopía óptica, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión. La elección de la inmunofluorescencia y la inmunohistoquímica depende de las instalaciones disponibles y de la experiencia del patólogo. La inmunofluorescencia es una técnica mayormente utilizada en Estados Unidos, mientras que la inmunohistoquímica se realiza con más frecuencia en Europa.⁸¹

Los resultados del estudio histopatológico nos darán información determinando el tipo de lesión, descartando patología tubular, intersticial o vascular.⁸¹ Pero hay que entender que el valor de la información se relaciona con la calidad de la biopsia y los procedimientos de procesamiento empleados. El estudio histopatológico tiene diferentes limitaciones, la primera es que el procesamiento de las muestras conlleva a procesos laboriosos e irreversibles, restringiendo el tipo y cantidad de análisis a realizar con el tejido en fresco, así como la realización de estudios moleculares posteriores al procesamiento de la muestra. La segunda es el tiempo que conlleva la preparación del tejido para su estudio; esto

es de especial importancia en aquellos padecimientos renales de rápida instauración en donde impera contar con un diagnóstico morfológico rápido para establecer estrategias terapéuticas a corto plazo que modifiquen favorablemente la evolución de la función renal del paciente.

El estudio histopatológico de la biopsia renal es una fuente importante de información que podría optimizarse, añadiendo a los patrones actuales de respuesta tisular y celular, la información de patrones moleculares que permitan implementar esquemas de terapia más personalizados. Para lograr esto, es fundamental equilibrar la balanza entre el tejido empleado para estudio morfológico y el preservado para estudios moleculares; a la vez que se garantice una correlación directa posible entre ambos métodos. En este contexto la técnica de microscopía confocal ex vivo constituía una herramienta potencial de estudio y los dos artículos publicados durante el desarrollo de esta tesis doctoral confirman que es un abordaje tecnológico que permite generar este punto de equilibrio en el ámbito de la nefropatología.

5.1 Flujo de trabajo de la Microscopía confocal ex vivo en biopsias renales

La microscopia confocal ex vivo es una técnica que nos permite evaluar la totalidad del tejido renal obtenido, sin realizar ninguna fragmentación, ya que el láser utilizado nos brinda cortes con imágenes de alta resolución. Esto nos permite obtener imágenes en tiempo real posteriores a la evaluación del tejido, equiparables con las obtenidas por la técnica histológica convencional.

Existe una amplia bibliografía que avala la utilidad de esta técnica en la evaluación de diferentes tejidos, desde los que son de fácil acceso como la piel, ojo y mucosas, y también en órganos internos como pulmón, tracto genitourinario, mama, hígado, tiroides, paratiroides, ganglios linfáticos y laringe.^{60-62,73} La aplicación más utilizada de la microscopia confocal ex vivo es la evaluación intraoperatoria de los márgenes tumorales durante la cirugía de Mohs para la

extirpación del carcinoma basocelular.⁸³⁻⁸⁵ Así mismo, se está utilizando para la diferenciación de tejido normal vs. tumoral en diferentes tipos de tumoraciones como en el cáncer de mama, de próstata o incluso tumoraciones renales.^{60-62,73}

En el primer trabajo realizado en esta tesis y que constituye la primera prueba de concepto publicada en la literatura sobre el rol de la microscopia confocal ex vivo en Nefro-patología, se evaluó la integridad del tejido no neoplásico obtenido por biopsia renal examinado inicialmente con microscopia confocal ex vivo y posteriormente se realizó análisis histopatológico, inmunohistoquímico y molecular.

La Figura 10 esquematiza el protocolo realizado posterior a la toma de la biopsia renal en esta tesis y constituye la propuesta para el futuro flujo de trabajo en Nefropatología. Una vez obtenida la muestra, se tiñó con naranja de acridina 0.6 mmol por 20 segundos, luego se realizó un lavado con solución salina por 20 segundos y luego se sumergió en ácido acético al 50% por 20 segundos y por último un nuevo lavado con solución salina. Una vez preparada la muestra, se colocó en un portaobjetos y se llevó a cabo el análisis por microscopía confocal ex vivo (modo fusión) el cual generó las imágenes en un periodo de tiempo de 3-5 min.

Una vez obtenidas las imágenes, se fragmentó la muestra extraída, la primera parte para el análisis de la histopatología convencional. El tejido en fresco se fijó en formol 10% y en bloque de parafina para poder analizar bajo microscopía óptica. El segundo fragmento se utilizó para realizar el análisis de inmunofluorescencia y el tercero para llevar a cabo el análisis de microscopía electrónica. Por último, este esquema de trabajo permitía llevar a cabo estudios de biología molecular utilizando técnicas ómics.

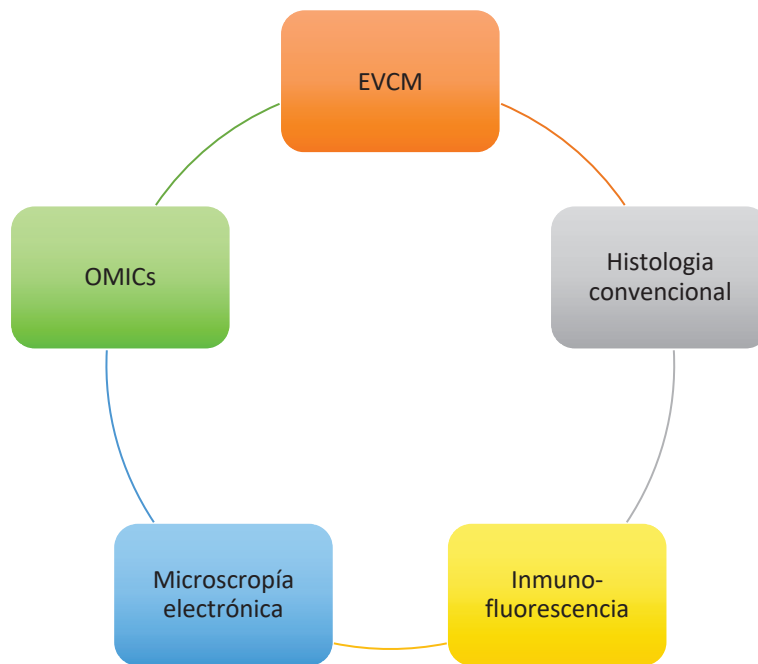


Figura 10: Esquema propuesto para el flujo de diagnóstico en nefropatología

La aplicación de este flujo de trabajo, en el primer trabajo publicado de esta tesis, permitió la obtención de imágenes de resolución tisular de biopsias renales en fresco, en un promedio de tiempo de 3 minutos, sin pérdida de tejido y manteniendo la integridad molecular del mismo. La evaluación del tejido obtenida primeramente con microscopia confocal ex vivo no interfirió con el examen de rutina posterior a la biopsia renal. Estos hallazgos demostraron que la microscopia confocal ex vivo puede ser el primer paso del flujograma en la evaluación de una biopsia renal con aplicaciones en el campo de la patología de riñón nativo y trasplantado.

5.2 Integridad del tejido posterior a la realización de microscopia confocal ex vivo para estudios moleculares, histoquímicos e inmunohistoquímicos

Ómics es el término general para caracterizar moléculas biológicas y aplicar su dinámica a la función y la causalidad en las ciencias de la vida y el campo médico.⁸⁶ En los últimos años, las técnicas ómics han recibido cada vez más atención debido a su promesa de descubrir nuevas vías, biomarcadores y factores de riesgo modificables para comprender, predecir, prevenir o tratar enfermedades. Además, el coste de medir y aplicar datos biológicos a gran escala ha disminuido, lo que facilita y promueve estudios de cohortes grandes para entender la fisiopatología de las enfermedades, generar avances en las terapias y el análisis de pacientes individuales mediante potentes algoritmos informáticos. El mantenimiento de la integridad molecular del tejido renal después del análisis con EVCM demostrado en el primer trabajo de esta tesis confirma que este abordaje permite preservar el tejido, ya caracterizado morfológicamente, para realizar futuras técnicas omics en patología de riñón nativo y trasplantado.

En el 2020, Phung y colaboradores realizaron el primer estudio para comparar el uso de la microscopia confocal vs. el tejido histopatológico fijado en formol en la determinación de tejido renal normal vs. tejido tumoral.⁷⁵ Ellos utilizaron la técnica de naranja de acridina para teñir ambas muestras de tejido. Posteriormente se tomaron imágenes de las muestras teñidas con microscopía confocal. Finalmente, las muestras fueron procesadas y teñidas con la tinción de hematoxilina y eosina para observarlas con microscopía óptica. Estas imágenes fueron utilizadas como control para comparar con las obtenidas con el microscopio confocal y no se encontraron dificultades con el procesamiento del tejido.⁷⁵

Posteriormente Mir y colaboradores realizaron el mismo procedimiento en la evaluación de tumoraciones renales.⁷⁶ Las muestras fueron teñidas con naranja de acridina y visualizadas posteriormente bajo microscopia confocal ex vivo con método de fusión. Se obtuvieron imágenes a los 2 minutos posterior al procedimiento. Al finalizar la toma de imágenes, se fijó la muestra en formol y

parafina para su posterior examen de rutina bajo microscopia óptica. Este estudio, permitió evaluar de forma certera 4 pacientes sin incidencias en el procesamiento de las muestras.

La técnica empleada en esta tesis, siguiendo el flujograma de microscopia confocal- histopatología- inmunofluorescencia- microscopía electrónica, permitió la obtención de imágenes de resolución tisular de biopsias renales en fresco, manteniendo la integridad molecular del mismo. La evaluación del tejido obtenido primeramente con microscopia confocal ex vivo no interfirió con el examen de rutina posterior a la biopsia renal ni con el aislamiento y cuantificación de ADN y ARN. Así mismo, las tinciones histopatológicas como el ácido periódico de Schiff, la de metenamina de plata y el tricrómico de Masson no mostraron cambios debido al proceso de las imágenes con los fluorocromos utilizados en la microscopia confocal. Las tinciones de inmunohistoquímica tampoco experimentaron cambios, mostrando resultados de alta calidad utilizando antígenos nucleares y de membrana.

Estos mismos hallazgos han sido corroborados en un trabajo con tumores de próstata en el que tampoco se registraron interferencias posteriores al procesamiento de la EVCM y se pudieron hacer ulteriores estudios de biología molecular.⁸⁷

5.3 Correlación de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal ex vivo con la microscopía óptica convencional

En esta tesis se ha confirmado que la microscopia confocal ex vivo es un método de estudio óptico que proporciona imágenes con buena resolución tisular de la biopsia renal, equiparables a las obtenidas después del procesamiento convencional (fijación en formol y procesamiento en parafina) y teñidas con hematoxilina y eosina.

Las imágenes obtenidas con el método de fusión de microscopía confocal, donde se combinan el modo de reflectancia con el de fluorescencia, nos brindan imágenes en color rosa/morado muy parecidas a las obtenidas con la tinción de hematoxilina y eosina, esto gracias a un algoritmo localizado en el microscopio que combina ambas longitudes de onda emitidas de 488 nm y 785 nm que dan un gráfico en rojo, verde y azul.

Estos hallazgos avalan la capacidad de la EVCM para complementar e incluso optimizar la información obtenida habitualmente con microscopia convencional. Además, la facilidad de uso y la reproducibilidad de la microscopía confocal permiten que en los servicios de anatomía patológica se puedan evaluar de forma más fácil y rápida las muestras obtenidas en la biopsia renal.

La calidad de las imágenes obtenidas permitió la caracterización de lesiones en los compartimientos glomerular, vascular y tubulointersticial. Estos hallazgos se habían descrito en estudios previos en tejido renal en modelo murino y en biopsias de tumores renales.^{72, 74-76} El primer trabajo de esta tesis en biopsias renales post mortem ilustró las posibilidades que ofrece la microscopia confocal ex vivo permitió la caracterización de fibrosis, inflamación con adecuada resolución. La concordancia entre la microscopia confocal ex vivo y la evaluación realizada de imágenes con tinción hematoxilina y eosina convencional fue alta. Esto sitúa a esta técnica como una opción para obtener imágenes digitales susceptibles de ser catalizadas mediante inteligencia artificial para su uso en investigación, ensayos clínicos o en la práctica clínica.⁸⁹ Adicionalmente, estas imágenes digitales aportarían información morfológica sobre los tejidos preservados para biobanco, uno de los elementos claves para la generación de futuros biomarcadores.⁹⁰

5.4 Identificación de patrones de lesión básicos en nefropatología a nivel glomerular, túbulo intersticial y vascular mediante microscopia confocal ex vivo

El primer estudio de la tesis, realizado en tejido renal post mortem y utilizando el análisis con microscopia confocal ex vivo; confirmo que la técnica identificaba lesiones relacionadas con daño crónico renal, tales como la glomeruloesclerosis global, la fibrosis intersticial, la atrofia tubular y las lesiones vasculares crónicas. Dichas alteraciones constituyen los parámetros del índice de cronicidad de la biopsia de riñón nativo, que se reconoce como un factor de riesgo de progresión a ERC independiente de la tasa de filtrado glomerular y la proteinuria.⁹¹⁻⁹³

Por otra parte, estas lesiones relacionadas con daño crónico son las variables evaluadas en las biopsias de donante cadavérico previo al trasplante renal.^{94,95} El uso de la EVCM en este campo tendría la ventaja de obtener una imagen digitalizada y consultable a distancia con los expertos en nefropatología. Lo que permitiría solventar algunas de las dificultades reconocidas en el contexto de la biopsia pre-implante para establecer la viabilidad del injerto renal.⁹⁶

5.5 Correlación de hallazgos de la microscopia confocal ex vivo vs. estudio óptico convencional en práctica clínica real

Los túbulos y el intersticio son los componentes más numerosos del parénquima renal y por esta razón, su representación en una biopsia es más uniforme si se compara con el compartimiento glomerular.⁹⁷ Los hallazgos reportados en el segundo trabajo de esta tesis confirman esta observación, mostrando un alto índice de concordancia entre la microscopía convencional y la tinción de hematoxilina y eosina digital obtenida con EVCM permitiendo una muy buena evaluación del daño tubular agudo y una clasificación sustancial de la fibrosis intersticial, la inflamación intersticial y las lesiones arteriales y arteriolas. La validación de estos resultados en futuros estudios permitiría establecer índices de lesión tubulointersticial que pueden aportar información pronóstica y posibles ajustes del esquema de terapia, durante la ventana de tiempo en que el paciente

permanece en observación tras la realización de la biopsia.⁹⁸⁻¹⁰¹ Igualmente abre una ventana para la optimización de los esquemas de nefroprotección.¹⁰²⁻¹⁰⁵

Aunque realizada en un número restringido de casos, la valoración de imágenes de microscopia confocal ex vivo mediante tinción de hematoxilina y eosina digital en el segundo trabajo de esta tesis, también permitió la identificación de glomérulos proliferación extracapilar. Esta información obtenida de forma precisa y rápida puede ser vital para mejorar el pronóstico de los pacientes con glomerulonefritis rápidamente progresiva en el contexto de vasculitis ANCA, enfermedad anti- membrana basal glomerular o en el lupus eritematoso sistémico. Confirmar estos hallazgos en una cohorte de pacientes de forma prospectiva, podría constituir una guía para el tratamiento urgente con pulsos de glucocorticoides, inmunosupresores, terapias biológicas o plasmaféresis en este escenario de urgencia de la medicina renal y se convertiría en otra aplicación de la microscopia confocal ex vivo en la práctica clínica habitual.^{106,107}

Finalmente, la microscopia confocal ex vivo puede ser de utilidad para la evaluación rápida de sospecha de amiloidosis renal. Aunque la concordancia para el parámetro de expansión mesangial fue moderada, los casos relacionados con depósito amiloide mostraron un patrón de fluorescencia homogéneo y de intensidad media, diferenciable del observado, por ejemplo, en la expansión mesangial asociada a nefropatía diabética. Biológicamente este hallazgo podría explicarse porque el amiloide puede teñirse con naranja de acridina. Usualmente se utilizan tinciones de histopatología con rojo Congo y tioflavina para observar la birrefringencia con el microscopio de luz polarizada. Sin embargo, en el 2017, Castellani y colaboradores demostraron la utilidad de la microscopia confocal para la detección de material amiloide utilizando ambas tinciones de rojo Congo y tioflavina.¹⁰⁸ Ambas técnicas mostraron diferencias significativas; con la microscopia confocal en muestra teñida con rojo Congo, se redujeron los falsos positivos de 17% a 5%, teniendo una sensibilidad y especificidad del 100%. Sin embargo, en las

muestras teñidas con tioflavina y analizadas con microscopia confocal, la sensibilidad para detección de amiloide fue del 100% pero utilizando muestras muy pequeñas. La capacidad de la EVCM para identificar amiloidosis renal demostrada en el segundo trabajo de esta tesis debe corroborarse en una cohorte de biopsias con mayor número de casos.

5.6 Limitaciones del estudio

La microscopia confocal ex vivo tiene algunas limitaciones. En el primer trabajo se confirmó que la inmersión en naranja de acridina interfiere con el examen del tejido renal con inmunofluorescencia, por lo que se debe evitar utilizar el cilindro renal destinado a esta técnica para realizar las imágenes mediante microscopia confocal ex vivo. Además, la presión horizontal aplicada al tejido, previamente a hacer el escaneo, puede ser no uniforme haciendo que porciones de la biopsia no se adhieran a la laminilla y den por resultado imágenes borrosas. Por este motivo es importante realizar una presión uniforme y gentil del tejido, evitando el aplastamiento que altere el tejido.

A pesar de la facilidad para obtener imágenes mediante la microscopia confocal ex vivo confirmada en el segundo estudio, el análisis de estas requiere de entrenamiento específico de un nefropatólogo. Además, las imágenes obtenidas corresponden a un nivel de corte, a diferencia de las secciones múltiples seriadas recomendadas en el estudio de biopsias renales. Este factor puede explicar la limitada correlación encontrada entre la EVCM y la microscopía convencional en la evaluación de esclerosis global.

Finalmente, como las imágenes digitales tienen un espectro de captación de $<5.0\ \mu\text{m}$ en el centro del campo visual, la evaluación de las características como la hipercelularidad endocapilar y mesangial es limitada. El grosor de captación,

sumado a la potencia del objetivo con el que trabaja el modelo de microscopio confocal empleado (cuarta generación VivaScope®, MAVIG GmbH, Múnich, Alemania) no permiten la correcta evaluación de las membranas basales glomerulares.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La microscopia confocal ex vivo es un método de estudio óptico que proporciona imágenes con buena resolución tisular de la biopsia renal, equiparables a las obtenidas después del procesamiento convencional, pero en tan solo 3 minutos, sin pérdida de tejido y manteniendo la integridad molecular del mismo.
2. Los resultados reportados en esta tesis demuestran el papel de la microscopia confocal ex vivo como el primer eslabón en el análisis de la biopsia renal. La tinción de hematoxilina y eosina digital permitió realizar una evaluación óptima del daño tubular agudo, de la fibrosis e inflamación intersticial y de las lesiones arteriales y arteriolas.
3. Este abordaje promueve el desarrollo de repositorios digitales y abre un camino para el diagnóstico molecular de rutina en nefropatología ya que permite posteriores estudios con técnicas omics.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Wang X, Garrett MR. Nephron number, hypertension, and CKD: physiological and genetic insight from humans and animal models. *Physiol Genomics*. 2017 Mar 01;49(3):180-192
2. Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley SM. The role of the immune system in kidney disease. *Clin Exp Immunol*. 2018 May;192(2):142-150.
3. Brown AL. The structure of the nephron. *Med Clin North Am*. 1966 Jul;50(4):927-35.
4. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Aug 07;9(8):1461-9.
5. McBride, J.M. (2016). Embryology, Anatomy, and Histology of the Kidney. In: Hansel, D., Kane, C., Paner, G., Chang, S. (eds) *The Kidney*. Springer, New York, NY.
6. Quaggin SE, Kreidberg JA. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development*. 2008 Feb;135(4):609-20.
7. Scott RP, Quaggin SE. Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015 Apr 27;209(2):199-210.
8. White KE. Research into the structure of the kidney glomerulus--making it count. *Micron*. 2012 Oct;43(10):1001- 9.
9. Davies M. The mesangial cell: a tissue culture view. *Kidney Int*. 1994 Feb;45(2):320-7.
10. Menè P, Cinotti GA. Paracrine and autocrine functions of glomerular mesangial cells. *J Endocrinol Invest*. 1989. Jul-Aug;12(7):497-509
11. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003 Jan;83(1):253- 307.
12. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Jan;11(1):1-8.

13. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007 Sep;17(9):428-37.
14. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 2007 Jun;71(12):1205-14.
15. Hebert LA, Parikh S, Prosek J, Nadasdy T, Rovin BH. Differential diagnosis of glomerular disease: a systematic and inclusive approach. *Am J Nephrol.* 2013;38(3):253-66.
16. Tapia C, Bashir K. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): May 9, 2023. Nephrotic Syndrome.
17. Vaziri ND. Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: mechanisms and consequences. *Kidney Int.* 2016 Jul;90(1):41-52.
18. Habib R, Lévy M, Gubler MC: Clinicopathological correlations in the nephrotic syndrome. *Paediatrician* 1979; 8: 325-348.
19. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med.* 2011 Dec 22;365(25):2398-411.
20. Sealfon R, Mariani L, Avila-Casado C, Nair V, Menon R, Funk J, et al. Molecular Characterization of Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2022 Jun;33(6):1208-1221.
21. Larsen CP, Messias NC, Silva FG, Messias E, Walker PD. Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies. *Mod Pathol.* 2013 May;26(5):709-15.
22. Bobart SA, De Vriese AS, Pawar AS, Zand L, Sethi S, Giesen C, et al. Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies. *Kidney Int.* 2019 Feb;95(2):429-438.
23. Dumas De La Roque C, Prezelin-Reydit M, Vermorel A, Lepreux S, Deminière C, Combe C, et al. Idiopathic Nephrotic Syndrome: Characteristics and Identification of Prognostic Factors. *J Clin Med.* 2018 Sep 9;7(9):265.

24. An Y, Xu F, Le W, Ge Y, Zhou M, Chen H, et al. Renal histologic changes and the outcome in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Feb;30(2):257-66.
25. Lamba P, Nam KH, Contractor J, Kim A. Nephritic Syndrome. *Prim Care*. 2020 Dec;47(4):615-629.
26. Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, Zand L, Meyer NC, Borsa N, et al. Atypical postinfectious glomerulonephritis is associated with abnormalities in the alternative pathway of complement. *Kidney Int*. 2013 Feb;83(2):293-9.
27. Fernández Juárez G, Villacorta Perez J. Glomerulonefritis Membranoproliferativa. En: Lorenzo V., López Gómez JM (Eds). *Nefrología al día*. ISSN: 2659-2606.
28. Tanaka S, Ninomiya T, Katafuchi R, Masutani K, Tsuchimoto A, Noguchi H, et al. Development and validation of a prediction rule using the Oxford classification in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(12):2082-90.
29. Jennette JC. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2003 Mar;63(3):1164-77.
30. Matovinović MS. 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFCC*. 2009 Apr 20;20(1):2-11.
31. Su CC, Chen JY, Chen SY, Shiao CC, Neyra JA, Matsuura R, et al. Outcomes associated with acute kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2022 Dec 13; 55:101760.
32. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Nov 23; 3:17088.
33. Baños ME, Núñez CA, Cabiedes J. Análisis de sedimento urinario. *Reumatol Clin*. 2010;6[5]:268-72.
34. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, James MT, Klarenbach S, Quinn RR, et al. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA*. 2010;303[5]:423-9.

35. Alcázar R, Egido J. Síndrome nefrótico: fisiopatología y tratamiento general. En: Hernando L. Nefrología Clínica. Tercera Edición. Madrid: Panamericana; 2008. p. 326-37.
36. Poggio ED, McClelland RL, Blank KN, Hansen S, Bansal S, Bombardier AS, et al. Kidney Precision Medicine Project. Systematic Review and Meta-Analysis of Native Kidney Biopsy Complications. Clin J Am Soc Nephrol. 2020 Nov 6;15(11):1595-1602.
37. Walker PD. The renal biopsy. Arch Pathol Lab Med. 2009 Feb;133(2):181-8.
38. Colvin RB. The renal allograft biopsy. Kidney Int. 1996 Sep;50(3):1069-82.
39. Hull KL, Adenwalla SF, Topham P, Graham-Brown MP. Indications and considerations for kidney biopsy: an overview of clinical considerations for the non-specialist. Clin Med (Lond). 2022 Jan;22(1):34-40.
40. Registro de Glomerulonefritis de la Sociedad Española de Nefrología <https://www.senefro.org/modules.php?name=webstructure&idwebstructure=80>
41. Bakdash K, Schramm KM, Annam A, Brown M, Kondo K, Lindquist JD. Complications of Percutaneous Renal Biopsy. Semin Intervent Radiol 2019, 36(2):97-103.
42. Dhaun N, Bellamy CO, Cattran DC, Kluth DC. Utility of renal biopsy in the clinical management of renal disease. Kidney Int 2014, 85(5):1039-1048.
43. Tyagi I, Majumdar K, Kamra S, Batra VV. Retrieval of kidney tissue for light microscopy from frozen tissue processed for immunofluorescence: A simple procedure to avoid repeat kidney biopsies. Indian J Nephrol. 2013 May;23(3):206-10.
44. Resch L, Yu W, Fraser RB, Lawen JG, Acott PD, Crocker JF, et al. T-cell/periodic acid-Schiff stain: a useful tool in the evaluation of tubulointerstitial infiltrates as a component of renal allograft rejection. Ann Diagn Pathol. 2002 Apr;6(2):122-4.
45. Farris AB, Alpers CE. What is the best way to measure renal fibrosis? A pathologist's perspective. Kidney Int Suppl (2011). 2014 Nov;4(1):9-15.

46. Hinds IL, Gonzales L. A methenamine-silver staining technique for glomerular basement membranes in plastic-embedded renal tissue. *Am J Med Technol.* 1982 Nov;48(11):909-13.
47. Walker PD. The renal biopsy. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Feb;133(2):181-8.
48. Barbour SJ, Espino-Hernandez G, Reich HN, Coppo R, Roberts ISD, Feehally J, et al. The MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. *Kidney International*, 89(1):167-175.
49. Coppo R, D'Arrigo G, Tripepi G, Russo ML, Roberts ISD, Bellur S, et al. Is there long-term value of pathology scoring in immunoglobulin A nephropathy? A validation study of the Oxford Classification for IgA Nephropathy (VALIGA) update. *Nephrol Dial Transplant.* 2020 Jun 1;35(6); 1002-1009.
50. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Bruijn JA, Colvin RB, Cook HT, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney Int* 2018, 93(4):789-796.
51. Pearson JM, McWilliam LJ, Coyne JD, Curry A. Value of electron microscopy in diagnosis of renal disease. *J Clin Pathol.* 1994 Feb;47(2):126-8.
52. Mokhtar GA, Jallalah SM. Role of electron microscopy in evaluation of native kidney biopsy: a retrospective study of 273 cases. *Iran J Kidney Dis.* 2011 Sep;5(5):314-9.
53. Ragazzi M, Longo C, Piana S. Ex Vivo (Fluorescence) Confocal Microscopy in Surgical Pathology: State of the Art. *Adv Anat Pathol.* 2016 May;23(3):159-69.
54. Hartmann D, Ruini C, Mathemeier L, Bachmann MR, Dietrich A, Ruzicka T, et al. Identification of ex-vivo confocal laser scanning microscopic features of melanocytic lesions and their histological correlates. *J Biophotonics.* 2017 Jan;10(1):128-142.
55. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom.* 2020 Mar;92(1):e68.

56. Guida S, Arginelli F, Farnetani F, Ciardo S, Bertoni L, Manfredini M, et al. Clinical Applications of In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy. *Appl. Sci.* 2021; 11, 1979.
57. Alarcon I, Carrera C, Palou J, Alos L, Malvehy J, Puig S. Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. *Br J Dermatol.* 2014 Apr;170(4):802-8.
58. Longo C, Ragazzi M, Rajadhyaksha M, Nehal K, Bennassar A, Pellacani G, et al. In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy for Dermatologic and Mohs Surgeons. *Dermatol Clin.* 2016 Oct;34(4):497-504.
59. Combalia M, Pérez-Anker J, García-Herrera A, Alos L, Vilaplana V, Marqués F, et al. Digitally Stained Confocal Microscopy through Deep Learning. In: Cardoso MJ, Feragen A, Glocker B, et al. (eds) *Proceedings of the 2nd International Conference on medical imaging with deep learning.* PMLR, 2019, London, pp 121–129.
60. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb R.H. Anderson, R.R. In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy of Human Skin: Melanin Provides Strong Contrast. *J. Investig. Dermatol.* 1995, 104, 946–952.
61. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol.* 1999 Sep;113(3):293-303.
62. Ragazzi M, Longo C, Piana S. Ex Vivo (Fluorescence) Confocal Microscopy in Surgical Pathology: State of the Art. *Adv. Anat. Pathol.* **2016**, 23, 159–169.
63. Cinotti E, Perrot JL, Labeille B, Cambazard F, Rubegni P. Ex vivo confocal microscopy: an emerging technique in dermatology. *Dermatol Pract Concept.* 2018 Apr 30;8(2):109-119.
64. Benati E, Pampena R, Bombonato C, Borsari S, Lombardi M, Longo C. Dermoscopy and reflectance confocal microscopy for monitoring the treatment of actinic cheilitis with ingenol mebutate gel: Report of three cases. *Dermatol Ther.* 2018 Jul;31(4):e12613.

65. Ragazzi M, Piana S, Longo C, Castagnetti F, Foroni M, Ferrari G, et al. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Mod Pathol.* 2014;27(3):460-71.
66. Horn M, Gerger A, Koller S, Weger W, Langsenlehner U, Krippel P, et al. The use of confocal laser-scanning microscopy in microsurgery for invasive squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2007;156(1):81-4.
67. Bennàssar A, Vilata A, Puig S, Malveyh J. Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery. *Br J Dermatol.* 2014; 170:360–5.
68. Tilli MT, Cabrera MC, Parrish AR, Torre KM, Sidawy MK, Gallagher AL, et al. Real-time imaging and characterization of human breast tissue by reflectance confocal microscopy. *J Biomed Opt.* 2007 Sep-Oct;12(5):051901.
69. Schiffhauer LM, Boger JN, Bonfiglio TA, Zavislan JM, Zuley M, Fox CA. Confocal microscopy of unfixed breast needle core biopsies: a comparison to fixed and stained sections. *BMC Cancer.* 2009 Aug 3;9:265.
70. Bickford LR, Agollah G, Drezek R, Yu TK. Silica-gold nanoshells as potential intraoperative molecular probes for HER2-overexpression in ex vivo breast tissue using near-infrared reflectance confocal microscopy. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Apr;120(3):547-55.
71. White WM, Tearney GJ, Pilch BZ, Fabian RL, Anderson RR, Gaz RD. A novel, noninvasive imaging technique for intraoperative assessment of parathyroid glands: confocal reflectance microscopy. *Surgery.* 2000 Dec;128(6):1088-1100; discussion 1100-1.
72. Campo-Ruiz V, Ochoa ER, Lauwers GY, González S. Evaluation of hepatic histology by near-infrared confocal microscopy: a pilot study. *Hum Pathol.* 2002 Oct;33(10):975-82.
73. Krishnamurthy S, Ban K, Shaw K, Mills G, Sheth R, Tam A, et al. Confocal Fluorescence Microscopy Platform Suitable for Rapid Evaluation of Small Fragments of Tissue in Surgical Pathology Practice. *Arch Pathol Lab Med.* 2019 Mar;143(3):305-313.

74. Su LM, Kuo J, Allan RW, Liao JC, Ritari KL, Tomeny PE, et al. 66 Fiber-optic confocal laser endomicroscopy of small renal 67 masses: toward real-time optical diagnostic biopsy. *J Urol* 68 2016;195:486e92.
75. Phung MC, Rouse AR, Pangilinan J, Bell RC, Bracamonte ER, Mashi S, et al. Investigation of confocal microscopy for differentiation of renal cell carcinoma versus benign tissue. Can an optical biopsy be performed? *Asian J Urol*. 2020 Oct;7(4):363-368.
76. Mir MC, Bancalari B, Calatrava A, Casanova J, Dominguez Escrig JL, et al. Ex-vivo confocal fluorescence microscopy for rapid evaluation of renal core biopsy. *Minerva Urol Nefrol*. 2020 Feb;72(1):109-113.
77. Parra E, Salgueira M, Portolés J, Serrano P, Bayés B, Estévez J, et al. Standardizing health outcomes for chronic kidney disease. Adaptation of the international consortium for health outcomes measurement standard set to the Spanish setting. *Nefrologia (Engl Ed)*. 2023 Sep-Oct;43(5):587-595.
78. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020 Feb 29;395(10225):709-733.
79. <http://www.ont.es/infesp/Paginas/RegistroEnfermosRenales.aspx>
80. Zhang T, Yang X, Zhang M, Zhou W, Jin Y, et al. Effects of receiving renal biopsy on the prognosis of chronic kidney disease patients with impaired renal function. *BMC Nephrol*. 2023 Mar 15;24(1):56.
81. Cohen AH, Nast CC, Adler SG, Kopple JD. Clinical utility of kidney biopsies in the diagnosis and management of renal disease. *Am J Nephrol*. 1989;9(4):309-15.
82. Najafian B, Lusco MA, Alpers CE, Fogo AB. Approach to Kidney Biopsy: Core Curriculum 2022. *Am J Kidney Dis*. 2022 Jul;80(1):119-131.
83. Mercuri SR, Rizzo N, Bellinzona F, Pampena R, Brianti P, Moffa G, et al. Digital ex-vivo confocal imaging for fast Mohs surgery in nonmelanoma skin cancers: An emerging technique in dermatologic surgery. *Dermatol Ther*. 2019 Nov;32(6): e13127.

84. Longo C, Rajadhyaksha M, Ragazzi M, Nehal K, Gardini S, Moscarella E, Lallas A, Zalaudek I, Piana S, Argenziano G, Pellacani G. Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue. *Br J Dermatol*. 2014 Sep;171(3):561-70.
85. Longo C, Ragazzi M, Castagnetti F, Gardini S, Palmieri T, Lallas A, et al. Inserting ex vivo fluorescence confocal microscopy perioperatively in Mohs micrographic surgery expedites bedside assessment of excision margins in recurrent basal cell carcinoma. *Dermatology*. 2013;227(1):89-92.
86. Grobe N, Scheiber J, Zhang H, Garbe C, Wang X. Omics and Artificial Intelligence in Kidney Diseases. *Adv Kidney Dis Health*. 2023 Jan;30(1):47-52.
87. Titze U, Sommerkamp J, Stege C, Schneider F, Brochhausen C, Schulz B, et al. Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy (FCM) Ensures Representative Tissue in Prostate Cancer Biobanking: A Feasibility Study. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 11;23(20):12103.
88. Schüürmann M, Stecher MM, Paasch U, Simon JC, Grunewald S. Evaluation of digital staining for ex vivo confocal laser scanning microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Jul;34(7):1496-1499.
89. Barisoni L, Lafata KJ, Hewitt SM, Madabhushi A, Balis UGJ. Digital pathology and computational image analysis in nephropathology. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Nov;16(11):669-685.
90. de Boer IH, Alpers CE, Azeloglu EU, Balis UGJ, Barasch JM, Barisoni L, et al. Kidney Precision Medicine Project. Rationale and design of the Kidney Precision Medicine Project. *Kidney Int*. 2021 Mar;99(3):498-510.
91. Srivastava A, Palsson R, Kaze AD, Chen ME, Palacios P, Sabbisetti V, et al. The Prognostic Value of Histopathologic Lesions in Native Kidney Biopsy Specimens: Results from the Boston Kidney Biopsy Cohort Study. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Aug;29(8):2213-2224.
92. Zhang X, Luo F, Chen R, Shen J, Liu X, Shi Y, et al. Use of Histologic Parameters to Predict Glomerular Disease Progression: Findings from the

China Kidney Biopsy Cohort Study. *Am J Kidney Dis.* 2023 Apr;81(4):416-424.e1.

93. Sethi S, D'Agati VD, Nast CC, Fogo AB, De Vriese AS, Markowitz GS, et al. A proposal for standardized grading of chronic changes in native kidney biopsy specimens. *Kidney Int.* 2017 Apr;91(4):787-789.
94. Girolami I, Gambaro G, Ghimenton C, Beccari S, Calì A, Brunelli M, et al. Pre-implantation kidney biopsy: value of the expertise in determining histological score and comparison with the whole organ on a series of discarded kidneys. *J Nephrol.* 2020 Feb;33(1):167-176.
95. Liapis H, Gaut JP, Klein C, Bagnasco S, Kraus E, Farris AB 3rd, et al. Banff Histopathological Consensus Criteria for Preimplantation Kidney Biopsies. *Am J Transplant.* 2017 Jan;17(1):140-150.
96. Zaza G, Cucchiari D, Becker JU, de Vries APJ, Eccher A, Florquin S, et al. European Society for Organ Transplantation (ESOT)-TLJ 3.0 Consensus on Histopathological Analysis of Pre-Implantation Donor Kidney Biopsy: Redefining the Role in the Process of Graft Assessment. *Transpl Int.* 2023; 36:11410
97. Nicolas N, Nicolas N, Roux E. Computational Identification and 3D Morphological Characterization of Renal Glomeruli in Optically Cleared Murine Kidneys. *Sensors.* 2021; 21(22):7440
98. Casal Moura M, Fervenza FC, Specks U, Sethi S. Kidney biopsy chronicity grading in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 2022;37(9):1710-1721.
99. Kang D, Ban TH, Chin HJ, Lee H, Oh SW, Park CW, et al. Prognostic value of chronicity grading on renal outcomes in patients with IgA nephropathy. *Front Med (Lausanne).* 2022; 9:952050.
100. Wilson PC, Kashgarian M, Moeckel G. Interstitial inflammation and interstitial fibrosis and tubular atrophy predict renal survival in lupus nephritis. *Clin Kidney J* 2018; 11:207–18.

101. MacGinley R, Champion De Crespigny PJ, Gutman T, Lopez-Vargas P, Manera K, Menahem S, et al. KHA-CARI Guideline recommendations for renal biopsy. *Nephrology (Carlton)*. 2019;24(12):1205-1213.
102. Li J, Albajrami O, Zhuo M, Hawley CE, Paik JM. Decision Algorithm for Prescribing SGLT2 Inhibitors and GLP-1 Receptor Agonists for Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020 Nov 6;15(11):1678-1688.
103. DeFronzo RA. Combination therapy with GLP-1 receptor agonist and SGLT2 inhibitor. *Diabetes Obes Metab* 2017; 19:1353-62.
104. De Nicola L, Gabbai FB, Garofalo C, Conte G, Minutolo R. Nephroprotection by SGLT2 Inhibition: Back to the Future? *J Clin Med*. 2020 Jul 15;9(7):2243.
105. Reidlinger DM, Johnson DW, Craig JC, McDonald SP, Mallard AR, Robison LE, et al. Implementation strategies for high impact nephrology trials: the end of the trial is just the beginning. *Kidney Int*. 2022;102(6):1222-1227.
106. Moroni G, Ponticelli C. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis: Early treatment is a must. *Autoimmun Rev*. 2014;13(7):723-9.
107. Anguiano L, Kain R, Anders HJ. The glomerular crescent: triggers, evolution, resolution, and implications for therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2020;29(3):302-309.
108. Castellani C, Fedrigo M, Frigo AC, Barbera MD, Thiene G, Valente M, et al. Application of confocal laser scanning microscopy for the diagnosis of amyloidosis. *Virchows Arch*. 2017 Apr;470(4):455-463.